

Aus der
Klinik für Neurologie
Direktor:
Prof. Dr. med. Dr. h.c. Wolfgang H. Oertel

des Fachbereichs Medizin der Philipps-Universität Marburg

Die Bedeutung von Neuregulin im 6-OHDA Tiermodell der Parkinson Krankheit

Inaugural-Dissertation zur Erlangung des Doktorgrades der gesamten Humanmedizin
dem Fachbereich Humanmedizin der Philipps-Universität Marburg

vorgelegt von
Friederike Rebecca Schindler
aus Marburg

Marburg 2014

Angenommen vom Fachbereich Medizin der Philipps-Universität Marburg

am 22. September 2014

Gedruckt mit Genehmigung des Fachbereichs.

Dekan: Prof. Dr. med. Helmut Schäfer

Referent: Prof. Dr. med. Dr. h. c. Wolfgang H. Oertel

1. Korreferent: Prof. Dr. G. Schratt

Meinem Sohn Jakob Leonard Schindler

*Ein Blick von dir, ein Wort mehr unterhält
Als alle Weisheit dieser Welt.*

(J. W. von Goethe)

Inhalt

I. Einleitung	1
I. 1. Das idiopathische Parkinson-Syndrom	2
I. 1. 1. Klassifizierung	2
I. 1. 2. Epidemiologie	2
I. 1. 3. Krankheitsbild	2
I. 1. 4. Neuroanatomie der Basalganglien	4
I. 1. 5. Funktionen der Basalganglien	4
I. 1. 6. Neuropathologie und Neurophysiologie des IPS	8
I. 1. 7. Die Rolle des oxidativen Stresses	10
I. 1. 8. Stellenwert und Wirkungsweise des 6-Hydroxydopamin-Modells	12
I. 1. 9. Neuroprotektion im Rahmen des IPS	15
I. 2. Neuregulin und Neuregulin-vermittelte Rezeptoraktivierung	19
I. 2. 1. Allgemeines über Neuregulin	19
I. 2. 2. NRG1 und seine biologische Funktion	19
I. 2. 3. Klassifizierung der von NRG1 codierten Neureguline	20
I. 2. 4. Strukturelle und funktionelle Charakterisierung der Neuregulin1-Isoformen	20
I. 2. 5. Neuregulin1- β 1	23
I. 2. 6. Der ErbB-Rezeptor und seine biologische Funktion	23
I. 2. 7. Liganden des ErbB-Rezeptors	23
I. 2. 8. Strukturbestandteile und deren Funktion	24
I. 2. 9. ErbB-Rezeptoren im nigrostriatalen System	25
I. 3. Zielsetzung der Arbeit	26
 II. Materialien und Methoden	 28
II. 1. Mäuse	28
II. 2. Substanzen	29
II. 3. Rezepte der selbsthergestellten Lösungen	30
II. 4. Geräte	31
II. 5. Sonstige Materialien	32
II. 6. Versuchsablauf	32

II. 7. Stereotaktische Operation	33
II. 8. Neuregulin1- β 1 Behandlung	35
II. 9. Amphetamin-induziertes Rotationsverhalten im Offenfeld	35
II. 10. Perfusion und Entnahme der Gehirne	36
II. 11. Mikrotomie	37
II. 12. Tyrosinhydroxylase-Immunfärbung	38
II. 13. Kresylviolett-Färbung nach Nissl	39
II. 14. Densitometrie	40
II. 15. Stereologie	41
II. 16. <i>Optical Fractionator</i> Methode	43
II. 17. Statistik	49
III. Ergebnisse	50
III. 1. Neuregulin1- β 1 schützt vor 6-OHDA-induziertem Rotationsverhalten	51
III. 2. Neuregulin1- β 1 schützt vor 6-OHDA-induziertem striatalen Faserverlust	52
III. 3. Neuregulin1- β 1 schützt vor 6-OHDA-induziertem nigralen Zelluntergang	54
IV. Diskussion	58
IV. 1. Limitationen der bisherigen Therapieoptionen	58
IV. 2. Diskussion der gewählten Methoden	59
IV. 3. Der Effekt von Neuregulin1- β 1 auf das dopaminerge nigrostriatale System im gesunden Kontrolltier	61
IV. 4. Neuregulin1- β 1 vermittelte Neuroprotektion	62
IV. 5. Bluthirnschrankengängigkeit von Neuregulin1- β 1	64
IV. 6. Stellenwert von Neuregulin im Vergleich zu anderen Neuroprotektiva	64
IV. 7. Limitationen, Perspektiven und Ausblick	67
V. Zusammenfassung	73
V. 1. Summary	75
VI. Abkürzungen	77
VII. Literaturverzeichnis	80

VIII. Publikation	94
IX. Tabellarische Auflistung der Ergebnisse der einzelnen Versuchstiere	95
X. Lebenslauf	96
XI. Verzeichnis der akademischen Lehrer	99
XII. Danksagung	100
XIII. Ehrenwörtliche Erklärung	101

I. Einleitung

Das idiopathische Parkinson-Syndrom (IPS) ist die zweithäufigste Bewegungsstörung. In Europa ist etwa jeder 55. der über 65-Jährigen betroffen, und mit zunehmendem Alter steigt diese Zahl stetig an. Eine kausale Therapieoption besteht bis zum heutigen Tage nicht.

Nach aktuellem Kenntnisstand können die Ursachen des IPS vielfältig sein, doch die Beschwerden, die den Leidensweg der Patienten ausmachen, sind stets sehr ähnlich. Hypokinetische Bewegungsstörungen dominieren das Krankheitsbild, bis hin zur völligen Bewegungsunfähigkeit, verschiedene Begleitsymptome können noch hinzutreten. Die körperlichen Einschränkungen ziehen die Konsequenz nach sich, dass mit zunehmender Erkrankungsausprägung immer mehr Patienten auf eine Teilnahme am sozialen Leben mit ihren Mitmenschen verzichten und sich gezwungen sehen, ihren Lebensabend zurückgezogen zu verbringen.

In der vorliegenden Dissertation wird in einem toxinbasierten Tiermodell mit Mäusen anhand von Verhaltensexperimenten und histologischen Arbeiten untersucht, ob die einfache intraperitoneale Injektion eines körpereigenen Wachstumsfaktors namens Neuregulin das Fortschreiten des Zelluntergangs in der Substantia nigra und somit das Fortschreiten der Erkrankung verlangsamen kann. Einem solchen Schutz der körpereigenen Nervenzellen, der als Neuroprotektion bezeichnet wird, müsste unter allen bisherigen Behandlungsansätzen höchste Bedeutung zugemessen werden.

Die Einleitung beinhaltet zunächst einen Überblick über den Wissensstand bezüglich des IPS unter Einbeziehung anatomischer und pathophysiologischer Zusammenhänge. Im Anschluss werden Grundlagen zum Thema der Neuroprotektion dargelegt und die aktuellen Kenntnisse über die Familie der Neureguline sowie den beteiligten Rezeptor geschildert. Zuletzt wird auf die Zielsetzung der Arbeit eingegangen.

I. 1. Das idiopathische Parkinson-Syndrom

I. 1. 1. Klassifizierung

Das IPS, synonym auch als Morbus Parkinson oder Parkinson'sche Krankheit bezeichnet, gehört zum Formenkreis der Parkinson-Syndrome. Unter diesen Überbegriff fallen des Weiteren folgende Krankheitsbilder: familiäre Parkinson-Syndrome, sekundäre (oder auch symptomatische), sowie atypische Parkinson-Syndrome. Zu letzteren zählen die Multisystematrophie, die progressive supranukleäre Blickparese, die kortikobasale Degeneration und die Demenz vom Lewy-Körper-Typ. Den Hauptteil unter den Parkinson-Syndromen stellt mit einem Anteil von 75% das IPS dar (Eggert et al., 2008).

I. 1. 2. Epidemiologie

Das IPS ist eine der häufigsten Bewegungsstörungen und stellt nach der Alzheimer-Krankheit die zweithäufigste neurodegenerative Erkrankung dar (Alves et al., 2008). Bei den über 65-Jährigen findet sich in Europa eine Prävalenz von 1,8% und bei den 85 - 89-Jährigen liegt sie bei 2,6% (de Rijk et al., 2000). In Deutschland beträgt die Prävalenz 100 - 200 pro 100000 Einwohner (Eggert et al., 2008). Die jährliche Inzidenz des IPS liegt bei 326 pro 100000 Einwohner, wobei sich diese Zahl auf die italienische Bevölkerung bezieht (Baldereschi et al., 2000). Daten bezüglich des Lebenszeitriskos, die in Olmsted County, MN, USA, erhoben wurden, ergeben einen Wert von 2,0% für Männer beziehungsweise von 1,3% für Frauen (Elbaz et al., 2002).

I. 1. 3. Krankheitsbild

James Parkinson, ein englischer Arzt, beschrieb im Jahre 1817 in seiner Arbeit „*An Essay on the Shaking Palsy*“ erstmalig anhand von sechs Patienten ein Krankheitsbild, das er selbst als Schüttellähmung (*Shaking Palsy*) bezeichnete (Parkinson, 1817). Der

Neurologe Jean-Martin Charcot führte 67 Jahre darauf die Bezeichnung Morbus Parkinson ein (Götz, 1986).

Nach der aktuellen Begriffsbestimmung des IPS muss zur Diagnosestellung das definierende Kardinalsymptom einer Brady- beziehungsweise Akinese vorliegen und zumindest durch eines der drei weiteren Leitsymptome ergänzt werden. Zu diesen zählen Rigor, ein Ruhetremor von 4 - 6 Hertz, der vornehmlich die distalen Extremitäten betrifft und durch Willkürbewegungen unterdrückt werden kann, sowie eine posturale Instabilität, wobei es sich bei dieser nicht um eine visuell, vestibulär, cerebellär oder propriozeptiv hervorgerufene Haltungsinstabilität handeln darf (Gibb und Lees, 1988; Eggert et al., 2008).

Es existiert allerdings eine Reihe von Konditionen, die das Vorliegen eines IPS ausschließen beziehungsweise unwahrscheinlich machen. Hierzu gehört etwa das Vorliegen von mehrfachen cerebral-ischämischen Ereignissen in der Krankenvorgeschichte, die mit einer stufenweisen Verschlechterung der Symptomatik assoziiert waren. Des Weiteren sollen ebenfalls weder wiederholte Schädel-Hirn-Traumata noch eine Enzephalitis oder eine Intoxikation mit beispielsweise Mangan, Kohlenmonoxid oder 1-Methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridin (MPTP) vorausgegangen sein. Bei einer Behandlung mit Dopaminrezeptorblockern (zum Beispiel Neuroleptika oder Metoclopramid), Valproinsäure, bestimmten Kalziumantagonisten oder Lithium zum Zeitpunkt des Erstauftretens ist das Vorliegen eines IPS ebenso wie bei Bestehen eines cerebralen Tumors, eines Hydrocephalus communicans oder zwischenzeitlichen Remissionen über längere Perioden eher unwahrscheinlich. Auch ein frühzeitiges Auftreten von Halluzinationen, dementiellen Syndromen, Störungen des autonomen Nervensystems oder Stürzen (bei früher posturaler Instabilität) sprechen gegen ein IPS. Ein nicht anderweitig erklärbares positives Babinski-Zeichen, cerebelläre Zeichen, sowie ein ausgeprägter Antekollis, eine deutliche Dysphagie oder Dysarthrie, eine supranukleäre vertikale Blickparese, eine Apraxie, fluktuierende Vigilanzminderungen und okulogyre Krisen ergänzen ebenfalls die Liste der sog. Warn-Symptome (Gibb und Lees, 1988; Eggert et al., 2008).

Auf der anderen Seite gibt es auch Symptome, die das Vorliegen eines IPS unterstützen. Hierzu gehören ein einseitiger Beginn beziehungsweise eine persistierende Asymmetrie,

der bereits beschriebene Ruhetremor, ein eindeutige Besserung der Symptome auf L-3,4-Dihydroxyphenylalanin (L-Dopa), mit Ausnahme des Ruhetremors, und die Abwesenheit der im vorausgegangenen Absatz aufgelisteten Warnkriterien (Gibb und Lees, 1988; Eggert et al., 2008).

I. 1. 4. Neuroanatomie der Basalganglien

Unterhalb des Cortex befinden sich die drei Kerngebiete Nucleus caudatus, Putamen und Pallidum (oder Globus pallidus), wobei erstere aufgrund ihrer streifenförmigen Verbindung untereinander oft als Corpus striatum zusammengefasst werden. Das Pallidum verfügt über einen medialen und einen lateralen Anteil.

Im Diencephalon liegt der bikonvexe Nucleus subthalamicus, der in einer starken funktionellen Beziehung zu den bisher genannten Strukturen steht - ebenso wie die Substantia nigra, die sich an der Basis des Tegmentum mesencephali befindet und in eine zellreichere Pars compacta sowie einer zellärmere Pars reticularis gegliedert wird. Diese fünf, jeweils bilateral angelegten, subkortikalen Kerngebiete werden zusammengefasst als Basalganglien. Da per definitionem ein „Ganglion“ nur im peripheren Nervensystem liegen kann, existiert ebenfalls der Begriff „Basalkerne“ und streng genommen zählen aus anatomischen Gründen weder der Nucleus subthalamicus noch die Substantia nigra dazu. Die Bezeichnung Basalganglien wird jedoch weiterhin wie oben beschrieben als Überbegriff für die genannten fünf Kerngebiete verwendet.

I. 1. 5. Funktionen der Basalganglien

Motorische kortikale Nervenimpulse, die zur Ausführung einer Bewegung führen können, unterliegen vor ihrer Weiterleitung an die ausführende Muskulatur zahlreichen Modifikationen, die im zentralen Nervensystem ablaufen und mitunter die Bewegungsinitiation, die Bewegungskoordination oder das Bewegungsausmaß betreffen können.

In den Basalganglien wird das exakte Ausmaß bewegungsfördernder und bewegungshemmender Einflüsse festgelegt (Obeso et. al., 2008). Störungen des Bewegungsausmaßes können sich beispielsweise in einer Hyper- oder Hypokinese äußern. Letzteres ist der Fall beim IPS.

Die Basalganglien verfügen über zwei Eingangsstationen und eine Ausgangsstation. Während das Corpus striatum und der Nucleus subthalamicus die Eingangsstationen repräsentieren, bilden Pallidum mediale und Pars reticularis der Substantia nigra die Ausgangsstation, die im Deutschen auch Pallidum-mediale-Komplex bezeichnet wird (De Long und Wichmann, 2007).

Die Eingangsstationen erhalten hauptsächlich Informationen aus dem Kortex. Von der Ausgangsstation gelangen die innerhalb der Basalganglien modifizierten Informationen zum Thalamus und von diesem wieder zurück zum Kortex oder direkt zum Hirnstamm. Ein vereinfachtes Verschaltungsschema wird in Abbildung 1 gezeigt.

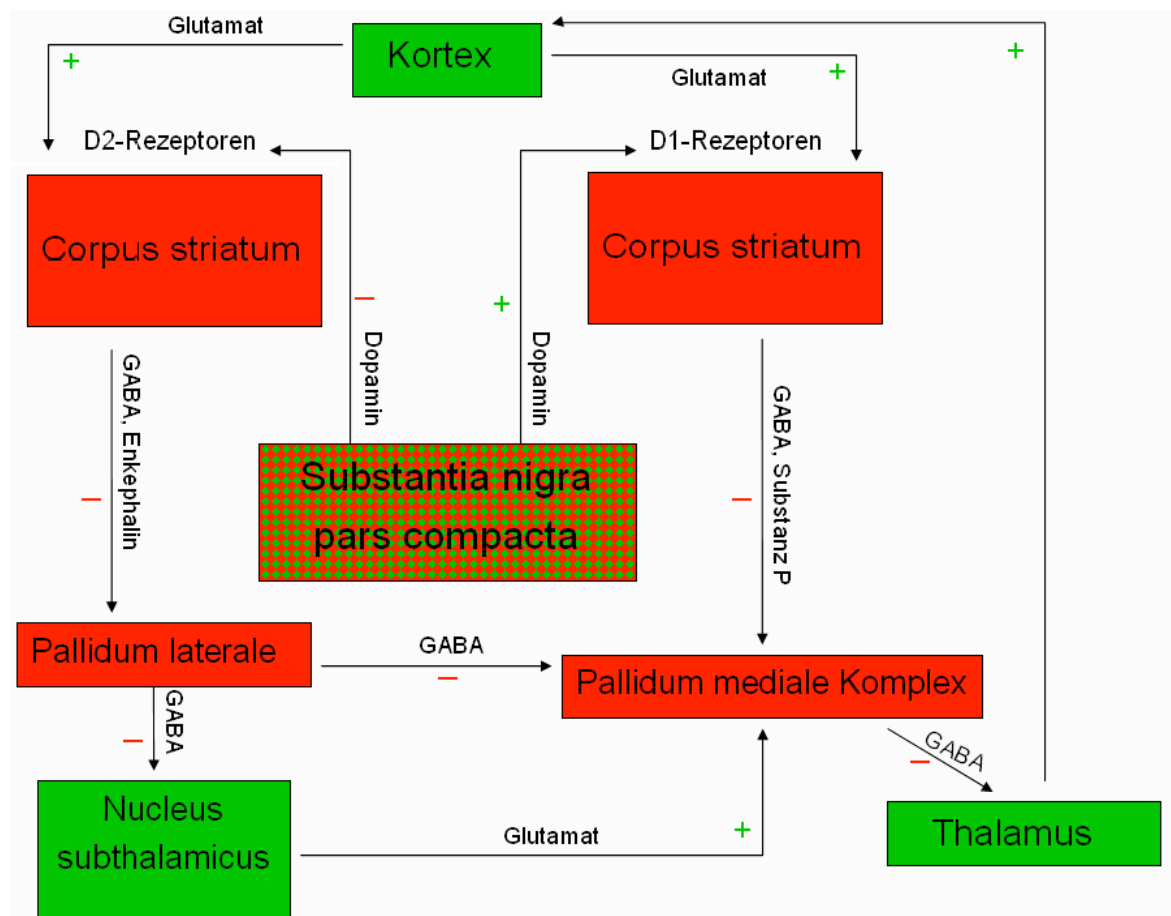


Abbildung 1) Innerhalb der Basalganglien wird das exakte Ausmaß der bewegungsfördernden und bewegungshemmenden Einflüsse festgelegt.
GABA = gamma-aminobutyric acid, dt. gamma-Aminobuttersäure

Die Ausgangsstation, der Pallidum-mediale-Komplex, bewirkt über inhibitorische Neurone mit tonischer Aktivität eine Hemmung der thalamokortikalen Erregungsübertragung, was einer Motorik-hemmenden Wirkung entspricht. De Long und Wichmann formulierten daher folgenden reziproken Zusammenhang: Zunehmender Informationsfluss aus den Basalganglien führt zu weniger Bewegung und abnehmender Informationsfluss führt zu mehr Bewegung (De Long und Wichmann, 2007). Diese Modellvorstellung wurde durch Experimente an Primaten untermauert (Hikosaka und Wurtz, 1983; Turner und Anderson, 2005; Obeso et al., 2008).

Der Pallidum-mediale-Komplex unterliegt jedoch fördernden und hemmenden Afferenzen, die ihn hauptsächlich über zwei Wege erreichen. Man spricht von einem direkten und einem indirekten Weg innerhalb der Basalganglien. Somit kann die tonische inhibitorische Aktivität der Ausgangsstation und damit auch ihre Motorik-hemmende Wirkung moduliert werden. Sowohl der direkte als auch der indirekte Weg nimmt seinen Anfang im Corpus striatum, dessen efferente Neurone über *gamma-aminobutyric acid* (GABA, dt. gamma-Aminobuttersäure) wirken und überbegrifflich als *medium spiny neurons* (MSN) bezeichnet werden (Obeso et al., 2008). Man unterteilt diese Neurone anhand ihrer Rezeptoren und Transmitter und somit auch anhand dessen, in welchen der beiden Wege sie projizieren, in zwei Hauptgruppen.

Beim direkten Weg wird die Information aus dem Corpus striatum ohne Zwischenstation an den Pallidum-mediale-Komplex geleitet. Die MSN dieses Weges verfügen über Dopamin D1-Rezeptoren, exprimieren neben GABA auch Substanz-P sowie Dynorphin und stellen eine monosynaptische inhibitorische Verbindung zum Pallidum-mediale-Komplex her (Obeso et al., 2008). Über den direkten Weg wird somit die dem Pallidum-mediale-Komplex eigene tonische inhibitorische Aktivität unterdrückt, sodass der direkte Weg eine Motorik-fördernde Funktion besitzt.

Die Neurone des indirekten Weges besitzen Dopamin D2-Rezeptoren, und exprimieren neben GABA zusätzlich Enkephalin. Sie projizieren zunächst inhibitorisch in das Pallidum laterale, welches anschließend ebenfalls inhibitorisch auf den Pallidum-mediale-Komplex wirkt. Dies geschieht entweder monosynaptisch oder über den Nucleus subthalamicus. In jedem Fall verfügt der indirekte Weg über zwei hintereinander geschaltete inhibitorische Verbindungen, bevor der Informationsfluss die

Ausgangsstation erreicht. In Anbetracht der Motorik-hemmenden Funktion des Pallidum-mediale-Komplex kommt dem indirekten Weg also eine Motorik-hemmende Wirkung zu.

Die Einstellung des Gleichgewichts zwischen der Motorik-fördernden Wirkung des einen und der Motorik-hemmenden Wirkung des anderen Weges wird maßgeblich durch den Einfluss von Dopamin aus den Neuronen der Substantia nigra pars compacta beeinflusst. Da die Perikarya dieser nigralen Neurone den Großteil ihrer Axone direkt in das Corpus striatum entsenden, spricht man vom nigrostriatalen dopaminergen Pfad. Durch Dopaminausschüttung wird über die striatalen D1-Rezeptoren der Informationsfluss über den direkten Weg gefördert und gleichzeitig der Informationsfluss über den indirekten Weg gehemmt (De Long und Wichmann, 2007). Dies lässt sich durch die exzitatorische Wirkung von Dopamin auf die D1-Rezeptoren und durch die inhibitorische auf die D2-Rezeptoren erklären. Die Substantia nigra pars compacta verfügt also durch ihre dopaminergen Neurone, die direkt in das Corpus striatum projizieren, über eine Motorik-fördernde Wirkung.

Weiterhin existieren verschiedenartige Typen von Interneuronen im Corpus striatum, die über verschiedene Neuropeptide, Stickstoffmonoxid, GABA oder Acetylcholin die Projektionsneurone innervieren, wobei die cholinerge Innervation des Corpus striatum von sehr hoher Dichte ist (Fujita et al., 2006).

Erwähnt werden soll an dieser Stelle auch der seit Kurzem postulierte hyperdirekte Weg, der dadurch gekennzeichnet ist, dass eine schnellere Signalvermittlung zwischen den motorischen Regionen des Kortex und dem Pallidum-mediale-Komplex über den Nucleus subthalamicus besteht (Nambu et al., 2002). Es wird allerdings vermutet, dass diese Verschaltung vor allem kognitive Einflüsse vermittelt (Aron et al., 2007).

Neben der Bewegungskontrolle kommt den Basalganglien noch eine Vielzahl weiterer Aufgaben zu, zum Beispiel im Rahmen von kognitiven und emotionalen Prozessen (Obeso et. al., 2008). Auf diese wird im Rahmen dieser Arbeit nicht näher eingegangen.

I. 1. 6. Neuropathologie und Neurophysiologie des IPS

Der fortschreitende Verlust dopaminerger Neurone in der Pars compacta der Substantia nigra und das Auftreten von neuronalen Proteinaggregaten, den sogenannten Lewy-Körperchen, in den verbleibenden Nervenzellen sind die wesentlichen neuropathologischen Kennzeichen des IPS (Wood-Kaczmar et al., 2006; Dickson et al., 2009).

Molekularer Hauptbestandteil der Lewy-Körperchen (Abbildung 2) ist das präsynaptische Protein Alpha-Synuclein (Spillantini et al., 1997). Die Frage, ob den Lewy-Körperchen toxische oder protektive Funktion zukommt, ist nicht abschließend geklärt. In letzter Zeit wurde vermehrt Anhalt dafür gefunden, dass nicht die Lewy-Körperchen selbst zellschädigend sind, sondern Zwischenprodukte des Aggregationsprozesses (Steiner et al., 2011).

Weiterhin konnte gezeigt werden, dass Alpha-Synuclein auch in sogenannten Pale-Körperchen vorkommt, deren Nachweis häufig begleitend zu dem der Lewy-Körperchen erbracht wird.

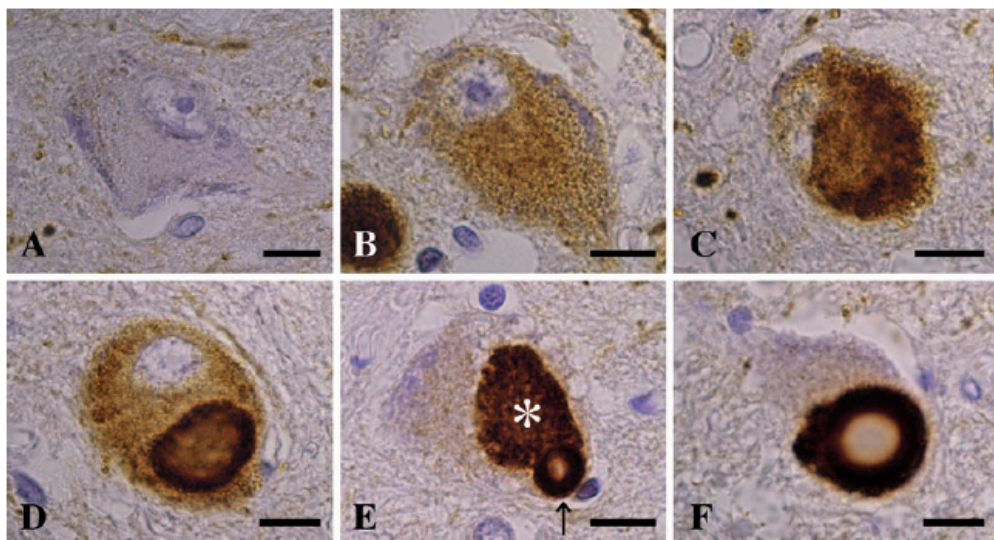


Abbildung 2) Alpha-Synuclein-Immunreaktivität von Lewy-Körperchen in verschiedenen Entwicklungsstadien in der Substantia nigra.
A: Keine Alpha-Synuclein-Immunreaktivität im Zytoplasma eines gesunden Neurons.
B: Diffuse, blasse zytoplasmatische Immunreaktivität.
C: Unregelmäßig geformte, uneinheitliche Immunreaktivität.
D: Diskrete Immunreaktivität des Pale-Körperchens.
E: Pathologische alpha-Synuclein Aggregation sowohl im Pale-Körperchen (*) als auch im Lewy Körperchen (↑).
F: Lewy-Körperchen.

Abbildung übernommen und Legende übersetzt von Wakabayashi et al., 2007

Der Untergang der nigralen Neurone manifestiert sich makroskopisch als Depigmentierung der Substantia nigra und funktionell als Ursache einer Dopaminverarmung im Corpus striatum. Dies führt zu einer Dysregulierung zwischen dem Motorik-fördernden direkten und dem Motorik-hemmenden indirekten Weg der oben beschriebenen motorischen Schaltkreise innerhalb der Basalganglien. Konsekutiv kommt es zum Auftreten des hypokinetisch-rigiden Syndroms im Rahmen des IPS (Wood-Kaczmar et al., 2006; Dickson et al., 2009).

Es herrscht allgemeiner Konsens darüber, dass bis zum Auftreten motorischer Symptome 40 bis 50% der dopaminergen Perikarya in der Substantia nigra zu Grunde gegangen sind und im Corpus striatum eine Verringerung des Dopamins um 60 bis 80% zu verzeichnen ist (Lang und Obeso, 2004). Zum Todeszeitpunkt leicht betroffener Erkrankter zeigt sich mitunter sogar ein 60%iger Verlust der dopaminergen Neurone und eine 80%ige Reduktion des striatalen Dopamingehalts (Zigmond und Burke, 2002). Insgesamt bedeutet dies, dass die Synaptopathie früher stattfindet als die Degeneration der Zellkörper.

Trotz intensiver Forschung ist der dem Neuronenverlust zugrunde liegende Mechanismus nur in Ansätzen verstanden. Diskutiert werden verschiedene molekulare und zelluläre Veränderungen (Abbildung 3), möglicherweise verursacht durch genetische Prädisposition (Simón-Sánchez et al., 2009), oxidativen Stress (Blum et al., 2001), abnormen Proteinmetabolismus (McNaught und Olanow, 2003), mitochondriale Dysfunktion (Schapira, 2006), Neuroinflammation (Hirsch und Hunot, 2009) Exzitotoxizität (Rodriguez et al., 1998) und Apoptose-Prozesse (Vila und Przedborski, 2003). Es ist nicht davon auszugehen, dass diese Prozesse einander ausschließen. Viel eher sind sie innig miteinander verwoben (Dawson und Dawson, 2003; Samii et al., 2004; Höglinger et al., 2005; Dickson et al., 2009).

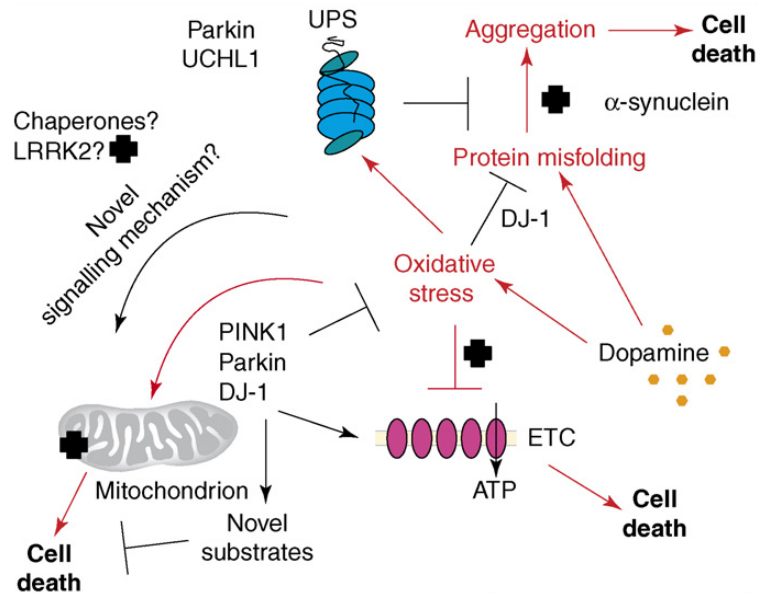


Abbildung 3) Mögliche Gründe für den Zelluntergang im Rahmen des IPS.

Abbildung übernommen von Wood-Kaczmar et al., 2006

I. 1. 7. Die Rolle des oxidativen Stresses

Oxidativer Stress stellt eine der wichtigsten Erklärungsmöglichkeiten bezüglich der nigralen neuronalen Degeneration beim IPS dar (Blum et al., 2001). Die Theorie des oxidativen Stresses besagt, dass eine durch hochreaktive Moleküle verursachte Zellschädigung zur neuronalen Degeneration beim IPS führt (Zigmond und Burke, 2002). Diese Moleküle zählen hauptsächlich zur Gruppe der *reactive oxygen species* (ROS, dt. reaktive Sauerstoffspezies). Der Begriff ROS umfasst eine Reihe sauerstoffhaltiger Radikale sowie einige nicht-radikalische Oxidantien und den Singulett-Sauerstoff. Synonym wird die Theorie des oxidativen Stresses auch als Theorie der freien Radikale bezeichnet. Einige Autoren grenzen Stickstoffmonoxid und Peroxynitrit als *reactive nitrogen species* (RNS, dt. reaktive Stickstoffspezies) von den ROS ab, andere benutzen ROS als Überbegriff für beide Spezies (Barnham et al., 2004). Im Rahmen der vorliegenden Arbeit soll der Begriff ROS die RNS miteinschließen. Durch ihre hohe Reaktionsfreudigkeit können ROS mit zahlreichen anderen Molekülen, zum Beispiel Membranlipiden, Proteinen und Nukleinsäuren reagieren und so auf verschiedene Zellbestandteile eine zerstörende Wirkung ausüben (Zigmond und Burke, 2002). Bei der Pathogenese des IPS scheinen einige ROS beteiligt zu sein.

Zum einen kann aus Dopamin durch enzymatische Oxidation mithilfe der Monoaminoxidase (MAO) Wasserstoffperoxid entstehen, welches bereits selbst zu den

ROS gezählt wird. Zum anderen kann sich eine als Fenton-Reaktion bezeichnete, weitere Oxidation anschließen, sodass das reaktivste der ROS, das Hydroxylradikal, freigesetzt wird (Fahn und Cohen, 1992). Damit die Fenton-Reaktion ablaufen kann, ist das Vorhandensein eines geeigneten Katalysators notwendig. Im Allgemeinen stellen Eisenionen diesen Katalysator dar und bei Patienten, die unter einem IPS leiden, ist eine Anhäufung von Eisenionen in der Substantia nigra zu verzeichnen (Martin, 2009).

Weiterhin kann Dopamin jedoch auch durch nicht-enzymatische Autooxidation zu verschiedenen ROS reagieren. Dadurch entstehen neben den bereits genannten Produkten auch Hyperoxid-Anionen. Als Zwischenprodukte fallen Chinone und Semichinone an, die ebenfalls selbst reaktive radikalische Verbindungen darstellen (Fahn und Cohen, 1992). Unterstützt wird die Theorie des oxidativen Stresses zusätzlich durch die Beobachtungen, dass in der Substantia nigra von IPS-Patienten eine erhöhte Lipidperoxidation sowie eine erniedrigte Konzentration von Glutathion, einem der wichtigsten Antioxidantien gefunden wird (Fahn und Cohen, 1992). Auch andere antioxidative Schutzmechanismen sind, als Zeichen für erhöhten oxidativen Stress, in der Substantia nigra bei IPS-Patienten gestört. So finden sich reduzierte Glutathionperoxidase- und Katalaseaktivitäten (Fahn und Cohen, 1992).

Im Rahmen anderer pathophysiologischer Erklärungsansätze spielt oxidativer Stress ebenfalls eine Rolle. Beispielsweise führt eine reduzierte Aktivität des Komplex I der mitochondrialen Atmungskette zu einem durch Adenosin-tri-phosphat (ATP)-Verarmung begründeten Energiedefizit der Zelle (Grundlage der Hypothese der mitochondrialen Dysfunktion). Gleichzeitig kommt es zur Zunahme von oxidativem Stress, welcher die Mitochondrien weiter schädigt, bis schließlich der Zelltod durch Apoptose eintritt (Wood-Kaczmar et al., 2006).

Erklärungsmodelle, die sich auf verschiedene genetisch bedingte prädisponierende Faktoren stützen, sind ebenfalls mit oxidativem Stress verknüpft. So schützen einige mit hereditären Parkinson-Syndromen assoziierte Gene wie *phosphatase and tensin homolog* (PTEN)-*induced putative kinase 1* (PINK1), *parkinson protein 2* (Parkin) und *parkinson protein 7* (DJ-1 / PARK7) vor oxidativem Stress und helfen die Integrität der Mitochondrien zu bewahren (Wood-Kaczmar et al., 2006).

Auch innerhalb der Theorie des abnormen Proteinmetabolismus kommt der Entstehung von erhöhtem oxidativen Stress Bedeutung zu. Da oxidativer Stress, wie bereits erwähnt, unter anderem schädigende Wirkung auf die Mitochondrien besitzt und eine konsekutive ATP-Verarmung für die Zelle bedeutet, wird ein als Ubiquitin-Proteasom-System bezeichneter Prozess, der für den Abbau von schädigenden intrazellulären Proteinen essentiell ist, in seiner Funktion gestört. Allerdings ist dies nur einer von mehreren möglichen Wegen, der zu einer Schädigung des Ubiquitin-Proteasom-Systems führen kann (McNaught und Olanow, 2003).

Obwohl eine Reihe von unabhängigen Beobachtungen existiert, welche die Theorie unterstützt, dass oxidativer Stress bei der Pathogenese des IPS eine eminente Rolle spielt, muss festgehalten werden, dass diese Theorie bestimmte Fragen bezüglich der Pathophysiologie des IPS nicht voll umfänglich erklären kann (Zigmond und Burke, 2002).

Beispielsweise die Tatsache, dass vor allem der ventrolaterale Teil der Substantia nigra pars compacta von der Neurodegeneration betroffen ist (Dickson et al., 2009), lässt sich nicht anhand der Theorie des oxidativen Stresses erklären (Zigmond und Burke, 2002).

I. 1. 8. Stellenwert und Wirkungsweise des 6-Hydroxydopamin-Modells

Viele Einblicke in die Pathogenese des IPS verdankt man insbesondere experimentellen Modellen, denen vornehmlich die Wirkungsweisen verschiedener toxischer Agenzien zugrunde liegen (Bové et al., 2005). In der vorliegenden Arbeit wurde auf ein bewährtes toxininduziertes Tiermodell zurückgegriffen, das auf der Wirkungsweise einer Substanz namens 6-Hydroxydopamin (6-OHDA) beruht. Dieses Modell zählt zu den wichtigsten Modellen im Rahmen der Ertestung neuer symptomatischer, transplantationschirurgischer, sowie - in begrenztem Maße - neuroprotektiver Therapieansätze (Bové et al., 2005).

6-OHDA ist die erste Substanz, der man sich in einem IPS-Modell bediente, um einen toxininduzierten Zelltod der Neurone der Substantia nigra hervorzurufen (Beal, 2001).

Es handelt sich um ein Dopaminderivat, das neben den beiden Hydroxylresten an Position drei und vier der Phenylgruppe einen weiteren Hydroxylrest an Position 6 trägt. Möglicherweise kann 6-OHDA als ein endogenes Neurotoxin erachtet werden, da es gelang, die Substanz im menschlichen Gehirn nachzuweisen (Blum et al., 2001). Des Weiteren erscheint 6-OHDA im Urin von mit L-Dopa behandelten IPS-Patienten (Blum et al., 2001). Durch seine Strukturähnlichkeit zu Dopamin und Noradrenalin zeigt es eine hohe Affinität zu einigen membranständigen Katecholamintransportern, wie dem Norepinephrin-Transporter (NET) und dem Dopamin-Transporter (DAT), und kann somit, wie bereits erwähnt, von katecholaminergen Neuronen und deren Fortsätzen aufgenommen werden (Bové et al., 2005).

Bereits 1971 schlugen Heikkila und Cohen vor, dass die durch 6-OHDA verursachte nigrostriatale dopaminerge Degeneration auf der Generation von oxidativem Stress beruhe (Heikkila und Cohen, 1971). Sowohl durch Autooxidation, als auch durch enzymatische Umwandlung, katalysiert durch die MAO, können aus 6-OHDA verschiedene hochreaktive Moleküle, wie Wasserstoffperoxid, Hydroxylradikale, Hyperoxid-Anionen und Chinonderivate entstehen (Saner und Thoenen, 1971; Blum et al., 2001). Die autooxidativen Prozesse scheinen dabei die bedeutendere Rolle zu spielen (Blum et al., 2001).

Weiterhin existieren Anhaltspunkte für Mechanismen, die über 6-OHDA zu einer mitochondrialen Dysfunktion führen können (Blum et al., 2001). So gehen Glinka et al. (1997) davon aus, dass eine Inhibition der Komplexe I und IV der mitochondrialen Atmungskette direkt auf eine Interaktion mit 6-OHDA und nicht durch beispielsweise aus 6-OHDA entstehende radikalische Verbindungen zurückzuführen ist.

Einige Eigenschaften von 6-OHDA gilt es zu beachten, um im Rahmen von Tiermodellen die degenerativen Prozesse des IPS möglichst exakt zu reproduzieren und die charakteristische relative Selektivität für die dopaminergen Neurone des nigrostriatalen Pfades hervorzurufen. Zum einen kann 6-OHDA die Blut-Hirn-Schranke nur spärlich passieren, zum anderen schädigt 6-OHDA ebenfalls noradrenerge Neurone sowohl im zentralen als auch im peripheren Nervensystem (Bové et al., 2005). Um ersteres zu umgehen, bietet sich als eine der geläufigsten Methoden die intracerebrale Injektion an (Ungerstedt und Arbuthnott, 1970). Der zweitgenannten Problematik

begegnet man durch zusätzliche Verabreichung von Noradrenalin-Wiederaufnahmehemmern, wie beispielsweise Desipramin, oder durch Wahl eines Injektionsortes, in welchem sich nur wenige noradrenerge Axone finden, zum Beispiel des Corpus striatum.

Häufig angewandt und umfassend charakterisiert ist das Modell der intracerebralen 6-OHDA-Injektion bei Ratten, jedoch wurde es in jüngerer Zeit auch zunehmend für Mäuse beschrieben (Iancu et al., 2005; Alvarez-Fischer et al., 2008). Sowohl eine uni- als auch eine bilaterale Injektion kann vorgenommen werden. Ein Vorteil der bilateralen Injektion besteht darin, dass beide Hirnhälften – wie beim IPS-Patienten – betroffen sind. Andererseits bringt dieses Vorgehen auch den bedeutenden Nachteil mit sich, dass die Mortalitätsrate der Versuchstiere infolge der durch die Operation entstehenden, schweren beidseitigen Dopaminverarmung und der damit einhergehenden Adipsie und Aphagie hoch ist (Bové et al., 2005). Eine unilaterale Läsion kann die Sterblichkeit deutlich reduzieren und führt des Weiteren zu einem Rotationsverhalten der Tiere, was man sich analytisch zu Nutze machen kann. Wählt man als Injektionsort die Substantia nigra oder das mediale Vorderhirnbündel, durch welches der nigrostriatale Pfad zieht, führt dies zu einem schnell einsetzenden, weniger apoptotischen, sondern eher nekrotischen Zelluntergang. In der Ratte gehen nach nigraler Injektion bereits zwölf Stunden postoperativ die Zellkörper in der Substantia nigra pars compacta zugrunde. Es folgt eine Dopaminverarmung im Corpus striatum, deren maximales Ausmaß bereits nach drei bis vier Tagen erreicht ist (Jeon et al., 1995; Bové et al., 2005). Dieses Modell ist vor allem für die Erforschung der Konsequenzen der Dopaminverarmung sehr wertvoll, spiegelt jedoch den langsam progredienten Verlauf des IPS unzureichend wider. Ein weiterer Nachteil bei nigraler Injektion ist das Artefakt, das durch den bei der Operation entstehenden Stichkanal erzeugt wird. Es kann einerseits durch den Gewebeverlust zu einer falsch niedrigen Zellzahl bei der Zellzählung führen und andererseits eine unspezifische Entzündungsreaktion hervorrufen.

In der vorliegenden Arbeit wurde eine unilaterale Injektion von 6-OHDA in das Corpus striatum durchgeführt, was mit einer langsamen, retrograden Degeneration der dopaminergen Zellen in der Substantia nigra einhergeht. Sauer und Oertel (1994) untersuchten dieses Modell bei der Ratte und fanden, dass sich der degenerative Prozess

in der Substantia nigra über 16 Wochen verfolgen ließ und dass sich dieser zudem viel später, nämlich erst nach ein bis zwei Wochen zeigte.

Das intrastriatale Modell für die Maus wurde ausführlich von Alvarez-Fischer et al. (2008) beschrieben. Sie konnten zeigen, dass drei Tage nach 6-OHDA Injektion die lädierte Seite noch etwa 66% der Zellzahl der unlädierten Seite aufweist, sieben Tage danach etwa 32%, 14 Tage später waren es circa 35%, nach 28 Tagen ungefähr 25% und nach 56 Tagen etwa 18%.

Eine unilaterale Injektion führt, wie bereits erwähnt, zu einem Rotationsverhalten der Tiere, welches durch Amphetamingabe im Rahmen dieser Arbeit forciert und anschließend quantifiziert wurde. Bereits 1970 hatten Ungerstedt und Arbuthnott gezeigt, dass dieses Rotationsverhalten quantitativ mit der Asymmetrie der dopaminergen Rezeptorstimulation der beiden Corpora striata korreliert (Ungerstedt und Arbuthnott, 1970).

I. 1. 9. Neuroprotektion im Rahmen des IPS

Mehrere Substanzen wurden bislang auf neuroprotektive Eigenschaften untersucht, insbesondere Antioxidantien, antiapoptotische Wirkstoffe, Dopaminagonisten, Glutamatantagonisten, MAO-B-Inhibitoren sowie der neuroimmunophiler Ligand GPI-1485 und *glial cell line-derived neurotrophic factor* (GDNF) (Parkinson Study Group, 1989, 1996, 2002, 2005; *German Coenzyme Q(10) Study Group*, 2007; Andringa et al., 2003; Saporito et al. 2002; Olanow et al., 1995, 2006; *National Institute of Neurological Disorders and Stroke: Neuroprotection Exploratory Trials in Parkinson's Disease* (NINDS NET-PD) *Investigators*, 2006; Rascol et al., 2002; Whone et al. 2003; Hauser und Holford, 2002; Löhle und Reichmann, 2010).

Antioxidantien waren der erste Ansatz für die Entwicklung einer neuroprotektiven Therapie. Anhand der *Deprenyl and Tocopherol Antioxidative Therapie of Parkinsonism Study* (DATATOP-Studie), an welcher 800 Patienten teilnahmen, wurden mit Hilfe eines prospektiven, doppelblinden, Plazebo-kontrollierten Designs Vitamin E und der MAO-B-Inhibitor Deprenyl (= Selegilin) auf mögliche neuroprotektive Effekte untersucht. Vitamin E lieferte keine Anhaltspunkte für einen langsamer fortschreitenden

Neuronenuntergang. In einer anderen, wesentlich kleineren Studie mit 21 IPS-Patienten fand man, dass eine höhere Dosierung möglicherweise zu einem anderen Ergebnis geführt hätte (Parkinson Study Group, 1989; Fahn und Cohen, 1992; Löhle und Reichmann, 2010). Die Ergebnisse der DATATOP-Studie für Deprenyl konnten nicht eindeutig dem symptomatischen Effekt der MAO-B-Inhibitor-Behandlung oder einer verzögerten neuronalen Degeneration zugeordnet werden (Schapira und Olanow, 2004).

Daraufhin untersuchte man noch zwei weitere Antioxidantien: Kreatin und Coenzym Q10. Für Kreatin kann bislang aufgrund der Studienlage nicht gelten, dass es eine neuroprotektive Wirkung beim Menschen besäße (Löhle und Reichmann, 2010). Für Coenzym Q10 ergaben sich zunächst, ähnlich wie für Deprenyl, interpretatorische Schwierigkeiten bei der Zuordnung der Studienergebnisse zu symptomatischen oder neuroprotektiven Effekten. Eine multizentrische, randomisierte, doppelblinde, Plazebo-kontrollierte Studie mit 131 IPS-Patienten lieferte Hinweise, dass Coenzym Q10 keinen symptomatischen Benefit verursache, was im Umkehrschluss zunächst nahe legte, dass die fraglich beobachteten, positiven Effekte möglicherweise Ausdruck einer neuroprotektiven Wirkung sein könnten (German Coenzyme Q(10) Study Group, 2007; Löhle und Reichmann, 2010). Zur näheren Beantwortung dieser Frage wurde daraufhin kürzlich in den USA eine große Phase III Studie durchgeführt. Zusammenfassend kann Coenzym Q10 jedoch kein neuroprotektiver Effekt zugesprochen werden (Chaturvedi und Beal, 2013).

Auch die drei antiapoptotisch wirksamen Substanzen Omigapil (TCH346), *mixed lineage kinase inhibitor* (CEP-1347) und Minozyklin wurden in klinischen Studien auf neuroprotektive Effekte untersucht. Für TCH346 und CEP-1347 gibt es keine Hinweise auf neuroprotektive Eigenschaften beim Menschen (Olanow et al., 2006). Minozyklin lieferte im Rahmen einer Studie mit 200 IPS-Patienten, die nicht auf die Untersuchung neuroprotektiver Effekte abzielte, erste Hinweise auf eine mögliche neuroprotektive Potenz (NINDS NET-PD *Investigators*, 2006; Löhle und Reichmann, 2010).

Die Auswertung der durchgeführten Studien über die neuroprotektive Wirkung der drei Dopaminagonisten Pramipexol, Ropinirol und Alpha-Dihydroergocriptin, bringt ebenfalls einige Schwierigkeiten mit sich. So verfügte bislang keine Studie über eine Plazebogruppe, sondern nur über eine mit L-Dopa als Goldstandard therapierte

Vergleichsgruppe (Parkinson Study Group, 2002; Whone et al., 2003). Während bildgebende Verfahren darauf hindeuteten, dass die mit Dopaminagonisten therapierten Patienten einen Benefit gegenüber den mit L-Dopa behandelten Patienten haben könnten, ließ sich dies am klinischen Bild der Patienten beider Gruppen nicht nachvollziehen (Löhle und Reichmann, 2010).

Rascol et al. (2002) fanden in einer großen klinischen Studie, in der 1084 IPS-Patienten entweder mit dem N-Methyl-D-Aspartat (NMDA)-Antagonisten Riluzol oder einem Placebo behandelt wurden, keine Hinweise darauf, dass Riluzol die Krankheitsprogression verzögern könne.

Der MAO-B-Inhibitor Deprenyl wurde abgesehen von der oben erwähnten DATATOP-Studie ebenfalls in der Sinemet-Deprenyl-Parlodel-Studie (SINDEPAR-Studie) untersucht, um die in der DATATOP-Studie aufgetauchte Differenzierungsproblematik zwischen symptomatischen und neuroprotektiven Effekten anzugehen. Man verwendete ein Design, bei dem man davon ausging, dass symptomatische Wirkungsweisen keinen Einfluss auf die Studienergebnisse haben würden. Dazu wurden die Patienten zusätzlich entweder zufälligerweise mit L-Dopa oder mit Bromocriptin behandelt. Zwei Monate bevor das Krankheitsbild abschließend beurteilt wurde, wurden Deprenyl beziehungsweise der Placebo abgesetzt, und sieben Tage vor der Beurteilung beendete man die L-Dopa- beziehungsweise Bromocriptinbehandlung. Die Ergebnisse der Studie deuteten zunächst auf einen neuroprotektiven Effekt hin (Parkinson Study Group, 1996; Olanow et al., 1995). Allerdings gibt es Hinweise, dass man L-Dopa erheblich früher hätte absetzen müssen, da erst nach 32 Tagen 90% der symptomatischen Langzeitwirkung von L-Dopa abgeklungen sind (Hauser und Holford, 2002).

Auch andere MAO-B-Inhibitoren sind bereits auf neuroprotektive Eigenschaften untersucht worden. So wurde beispielsweise die *RO 19-6327 Assessment and Dose finding study* (ROADS-Studie) durchgeführt, um den Effekt von Lazabemid zu untersuchen. Da die Studie ähnlich wie die DATATOP-Studie angelegt war, birgt sie ähnliche Interpretationsschwierigkeiten (Löhle und Reichmann, 2010). Ein anderes Design und einen anderen MAO-B-Inhibitor verwendete man wiederum in der *TVP-1012 in early monotherapy for PD outpatients study* (TEMPO-Studie). 404 zuvor unbehandelte IPS-Patienten erhielten je nach Gruppenzugehörigkeit entweder 6 Monate

lang einen Placebo und im Anschluss für 6 Monate den MAO-B-Inhibitor Rasagilin oder für volle 12 Monate Rasagilin. In diesem sogenannten *Delayed-Start-Design* zeigten die Patienten, die Rasagilin für 12 Monate erhalten hatten, einen signifikanten Benefit bezüglich des Schweregrads ihrer motorischen Symptome (Parkinson Study Group, 2005). Allerdings war der Unterschied eher gering und die klinische Relevanz wird hinterfragt (Löhle und Reichmann, 2010).

Der neuroimmunophile Ligand GPI-1485 zeigte bislang lediglich nicht-signifikante Ergebnisse, die für neuroprotektive Effekte sprechen könnten. So sollte er nochmals in einer klinischen Phase III Studie untersucht werden (Löhle und Reichmann, 2010).

Die Studienlage bezüglich des neurotrophischen Faktors GDNF ist bislang ebenfalls nicht eindeutig (Löhle und Reichmann, 2010). Eine Therapie mit GDNF würde allerdings mit mehreren bereits jetzt absehbaren Problemen assoziiert sein. So sollte man GDNF beispielsweise nicht peripher, sondern intracerebral verabreichen (Nutt et al., 2003). Weiterhin wurde bereits beobachtet, dass einige IPS-Patienten neutralisierende anti-GDNF Antikörper entwickelten (Löhle und Reichmann, 2010). Versuche mit Rhesusaffen zeigten einen Verlust der cerebellären Purkinje-Zellen, sowie behandlungsassoziierte cerebelläre Schäden (Hovland et al., 2007).

Zusammenfassend ist festzuhalten, dass bisher keine neuroprotektive Therapie im Rahmen der Behandlung des IPS etabliert werden konnte, und dass von den bisher zur Verfügung stehenden Medikamenten keines gesicherte neuroprotektive Eigenschaften mit klinisch relevanten Effekten besitzt.

I. 2. Neuregulin und Neuregulin-vermittelte Rezeptoraktivierung

I. 2. 1. Allgemeines über Neuregulin

Neureguline sind Signal-Proteine im Rahmen der Zell-Zell-Kommunikation und kommen in zahlreichen Organsystemen vor (Falls, 2003). Im Nervensystem werden die Neureguline reichhaltig exprimiert, wobei der größere Teil der Expression von Nervenzellen gewährleistet wird (Rio et al., 1997). Es existieren 4 Neuregulin-Gene (NRG): NRG1, NRG2, NRG3 und NRG4. Sie codieren für eine Vielzahl von Wachstums- und Differenzierungsfaktoren (Esper et al., 2006; Mei und Xiong, 2008). Je nachdem von welchem Gen die einzelnen Isoformen codiert werden, spricht man von Neuregulin1-, Neuregulin2-, Neuregulin3- oder Neuregulin4-Isoformen.

I. 2. 2. NRG1 und seine biologische Funktion

Das am besten untersuchte und verstandene Neuregulin-Gen ist NRG1 (Birchmeier, 2009; Mei und Xiong, 2008). Es befindet sich auf dem kurzen Arm des Chromosom 8 und besitzt eine Länge von 1,125 Megabasen (Steinthorsdottir et al., 2004). Aufgrund verschiedener genregulatorischer Elemente und alternativem Spleißen können aus der *precursor messenger ribonucleic acid* (prä-mRNA) von NRG1 sechs Proteintypen (Typ I bis VI) mit insgesamt mindestens 31 Neuregulin-1-Isoformen entstehen (Mei und Xiong, 2008).

Die Neuregulin1-Isoformen spielen eine wichtige Rolle bei neuronalen Entwicklungsprozessen wie der Neurogenese, Migrationsprozessen, zielgerichtetem axonalen Aussprossen und der Expression verschiedener Neurotransmitter und Rezeptoren beziehungsweise deren Untereinheiten (Buonanno und Fischbach, 2001; Talmage, 2008). Des Weiteren beeinflussen sie das Überleben von Nervenzellen sowie die Aufrechterhaltung von Plastizität in neuronalen Schaltkreisen (Talmage, 2008). Proliferation, Wachstum und Differenzierung von Gliazellen werden ebenfalls maßgeblich durch Neuregulin1-Isoformen beeinflusst (Buonanno und Fischbach, 2001).

I. 2. 3. Klassifizierung der von NRG1 codierten Neureguline

Die Klassifizierung der sechs aus NRG1 hervorgehenden Proteintypen erfolgt anhand der jeweiligen N-terminalen Aminosäure-Sequenz (Mei und Xiong, 2008), siehe Abbildung 4. Während die Typen I, II und III bei allen Vertebraten vorkommen, sind die Typen IV, V und VI bislang nur bei Primaten nachgewiesen worden (Talmage, 2008). Die ursprünglichen Bezeichnungen *acetylcholine receptor-inducing activity* (ARIA), *glial growth factor* (GGF), *heregulin* (HER), *neu differentiation factor* (NDF) und *sensory and motor neuron-derived factor* (SMDF) für verschiedene Isoformen sollten überdacht werden, da sie nicht immer auf die tatsächliche Funktion des Proteins hinweisen. So wurde beispielsweise Typ II ursprünglich als GGF bezeichnet. Nach heutigem Kenntnisstand scheint allerdings *in vivo* eher Typ III als glialer Wachstumsfaktor zu fungieren (Falls, 2003).

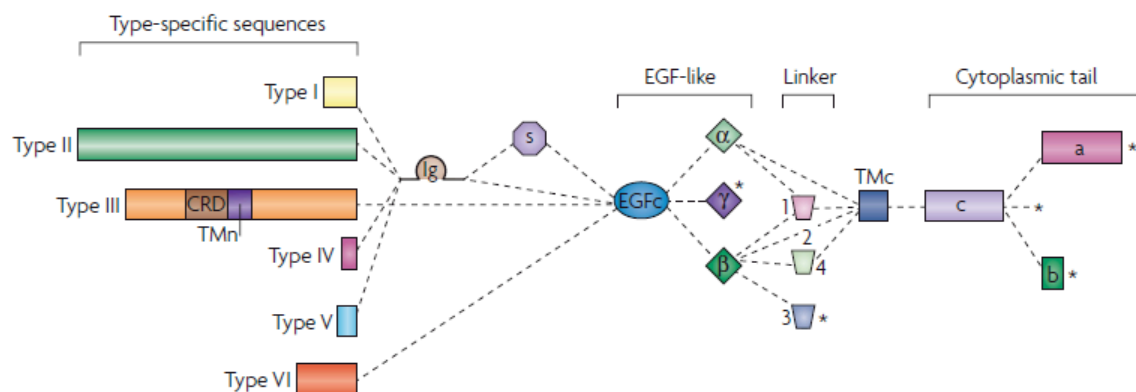


Abbildung 4) Die N-terminale Aminosäuresequenz dient der Klassifizierung der aus NRG1 hervorgehenden Proteintypen.

Abbildung übernommen von Mei und Xiong, 2008

I. 2. 4. Strukturelle und funktionelle Charakterisierung der Neuregulin1-Isoformen

Allen Neuregulin1-Isoformen ist eine *epidermal growth factor* (EGF)-ähnliche Domäne gemein, die ihrerseits je nach Typ entweder eine α -, β - oder γ -Untereinheit besitzt (Mei und Xiong, 2008). Die EGF-ähnliche Domäne ist ein wichtiger struktureller Bestandteil, da sie membranständige Tyrosinkinasen der *erythroblastic leukemia viral oncogene*

homolog (ErbB)-Rezeptoren aktivieren kann (siehe I. 2. 6. Der ErbB-Rezeptor und seine biologische Funktion) und die meisten biologischen Effekte des gesamten Proteins zu imitieren vermag (Buonanno und Fischbach, 2001). Diejenigen NRG1-Isoformen, die eine β -Untereinheit in ihrer EGF-ähnlichen Domäne aufweisen, verfügen über eine deutlich höhere Rezeptoraffinität und kommen häufiger im Gehirn vor als die α -EGF-Isoformen (Harrison und Law, 2006; Talmage, 2008).

Einige Neureguline besitzen weiterhin eine Immunglobulin (Ig)-ähnliche Domäne, weswegen man in diesem Zusammenhang von Ig-Neuregulinen spricht. Die Neureguline der Typen I, II, IV und V besitzen zwischen dem N-terminalen Ende und der EGF-ähnlichen Domäne diesen Ig-ähnlichen Bereich, auf den bei einigen Isoformen eine reich glykosylierte Spacer-Region folgt (Buonanno und Fischbach, 2001; Mei und Xiong, 2008). In peripheren Nerven und in Geweben außerhalb des Nervensystems unterstützt die Ig-ähnliche Domäne verschiedene Interaktionen der Neureguline mit Komponenten der extrazellulären Matrix, beeinflusst die Entfernung, über welche die Neureguline wirken, sowie deren Konzentration am Wirkort (Li und Loeb, 2001; Talmage, 2008). Des Weiteren induzieren Ig-Neureguline eine längere ErbB-Rezeptorphosphorylierung und eine höhere Syntheserate von Acetylcholin-Rezeptoren (Falls, 2003).

Die meisten Neuregulin1-Isoformen werden in Form einer membranassoziierten Vorstufe synthetisiert, genannt pro-Neuregulin1 (Abbildung 5), wobei das N-terminale Ende und die Ig- und EGF-ähnlichen Domänen in den Extrazellulärraum gerichtet sind (Mei und Xiong, 2008). Anders als die meisten löslichen und transmembranen Proteine besitzen die Neureguline keine klassische N-terminale Signalsequenz, welche die unreifen Proteine zur Prozessierung zum endoplasmatischen Retikulum leitet (Falls, 2003). Es scheinen verschiedene andere Bereiche diese Funktion zu übernehmen (Falls, 2003).

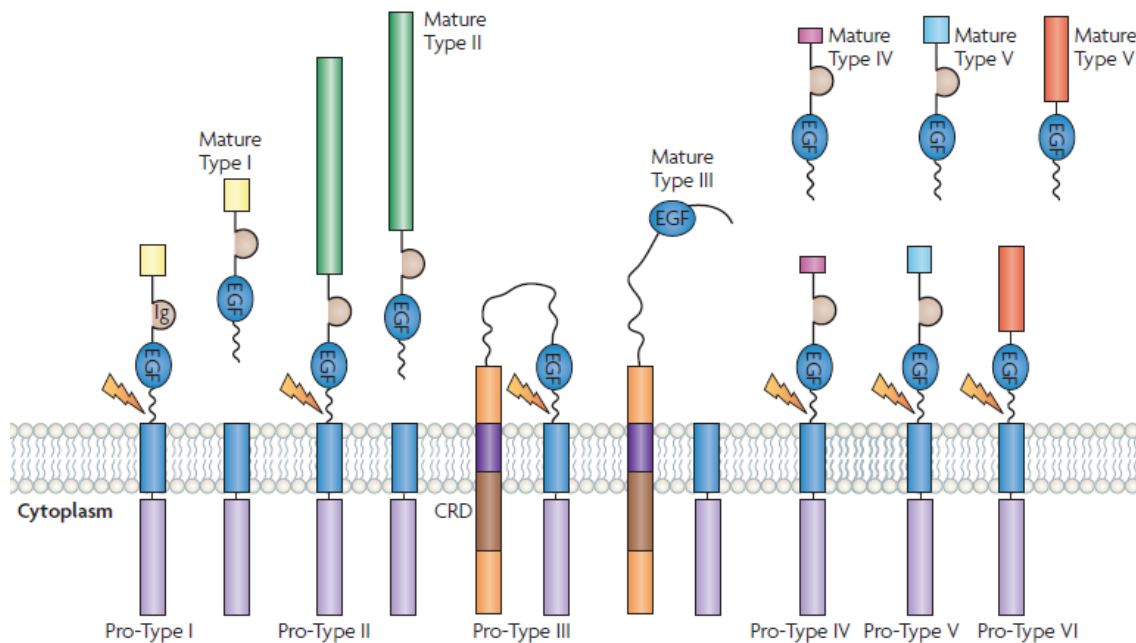


Abbildung 5) Mit Ausnahme von Neuregulin1 Typ III werden die Neuregulin1-Isoformen als membranassoziierte Vorstufe (pro-Neuregulin1) synthetisiert, wobei das N-terminale Ende und die Ig- und EGF-ähnlichen Domänen in den Extrazellulärraum gerichtet sind.

Abbildung übernommen von Mei und Xiong, 2008

Durch proteolytische Spaltung zwischen der EGF-ähnlichen Domäne und der transmembranen Domäne entstehen die reifen, löslichen Isoformen (Harrison und Law, 2006). Eine Ausnahme stellt Neuregulin1 Typ III dar, der über eine zweite transmembrane Region verfügt und somit nach der proteolytischen Spaltung mit beiden Teilen weiterhin membrangebunden bleibt und eher juxtakrine Funktionen erfüllt oder als Rezeptor fungiert (Esper et al., 2006; Talmage, 2008). Die Spaltung kann durch folgende drei Typ I Transmembran-Proteasen katalysiert werden: *tumour necrosis factor- α converting enzyme* (TACE oder ADAM17), *β -site of amyloid precursor proteine cleaving enzyme* (BACE oder Memapsin 2) oder *meltrin beta* (ADAM19) (Mei und Xiong, 2008). Einige Neuregulin-Isoformen fungieren lediglich als Ligand – dieser Prozess wird unidirektionale Signalvermittlung bezeichnet – andere wirken zusätzlich als Rezeptor retrograd auf das Neuregulin-exprimierende Neuron zurück – was daher bidirektionale Signalvermittlung heißt (Talmage, 2008).

I. 2. 5. Neuregulin1- β 1

Das in der vorliegenden Arbeit verwendete Neuregulin1- β 1 ist eine vom NRG1-Gen codierte lösliche Isoform, die *in vivo* nach der proteolytischen Spaltung der membrangebundenen Form freigesetzt werden kann. Es besitzt folgende der zuvor beschriebenen extrazellulären Bestandteile: ein N-terminales Typ I Ende, eine Ig-ähnliche Domäne, eine glycosylierte Spacer-Region und eine EGF-ähnliche Domäne mit der β -Untereinheit. Da die Neuregulin1 Typ I-Isoformen mit einer raschen Freisetzung ihrer löslichen Isoform verbunden sind, ist es wahrscheinlich, dass es nur zu einer unidirektionalen Signalvermittlung kommt (Talmage, 2008).

Neuregulin1- β 1 besteht aus 245 Aminosäuren bei einem Molekulargewicht von etwa 26,9 Kilodalton (kDa) (R&D Systems, Inc., Minneapolis, USA, Datenblatt Katalognummer 377-HB/CF).

I. 2. 6. Der ErbB-Rezeptor und seine biologische Funktion

Die vier ErbB-Rezeptoren ErbB1 (= EGF-Rezeptor, EGFR, Her1), ErbB2 (= Her2/Neu2, Her2/c-neu) ErbB3 (=Her3) und ErbB4 (= Her4) sind membranständige Rezeptor-Tyrosinkinasen (Birchmeier, 2009). Der Name leitet sich von dem Genprodukt des Erythroblastosis Virus ab, welches von einer verkürzten und mutierten Form eines ErbB-Rezeptor-Gens codiert wird (Citri und Yarden, 2006; Birchmeier, 2009). Die Bezeichnung „Her“ steht für humane EGF-Rezeptoren. Die ErbB-Rezeptoren regulieren Überleben, Proliferation, Differenzierung und Bewegung von Zellen (Linggi und Carpenter, 2006; Samaga et al., 2009).

I. 2. 7. Liganden des ErbB-Rezeptors

Die ErbB-Rezeptoren binden als Liganden mitunter folgende elf Wachstumsfaktoren beziehungsweise verschiedene Isoformen ihrer Familien: EGF, *transforming growth factor alpha* (TGF α), *heparin-binding EGF-like growth factor* (HB-EGF), Amphiregulin, Betacellulin, Epigen, Epiregulin, Neuregulin1, Neuregulin2,

Neuregulin3 und Neuregulin4 (Linggi und Carpenter, 2006; Cymer und Schneider, 2010). Alle diese Liganden besitzen eine EGF-ähnliche Domäne (Citri und Yarden, 2006). Sie binden mit unterschiedlicher Präferenz an die verschiedenen ErbB-Rezeptoren und lassen sich anhand dessen in Gruppen einteilen (Olayioye et al., 2000). Neuregulin1 bindet vornehmlich an ErbB3 und ErbB4 (Linggi und Carpenter, 2006; Olayioye et al., 2000).

I. 2. 8. Strukturbestandteile und deren Funktion

Die gemeinsame Struktur der ErbB-Rezeptoren besteht aus einem N-terminalen extrazellulären, einem transmembranen und einem C-terminalen cytoplasmatischen Bereich. Der extrazelluläre Bereich untergliedert sich in vier Domänen. Die Domänen I und III dienen der Ligandenbindung. Im zytoplasmatischen Anteil befinden sich die Tyrosinkinase-Domäne, ein tyrosinreicher Phosphorylierungsbereich und eine juxtamembrane Region (Linggi und Carpenter, 2006).

Die ErbB-Rezeptoren besitzen ein hohes Maß an Signaldiversität (Olayioye et al., 2000). Es handelt sich bei der ErbB-Rezeptor-vermittelten Signalweiterleitung nicht um einen einfachen linearen Pfad, sondern um ein stark verwobenes Netzwerk, in welchem erst die Kombinationen der möglichen Expressionen und Aktivierungen eine spezifische biologische Antwort versprechen (Yarden und Sliwkowski, 2001).

In letzter Zeit wurde zunehmend die Theorie postuliert, dass die Rezeptoren der ErbB-Familie nicht nur typische intrazelluläre Signalwege in Gang setzen, sondern auch nach einem Transport in den Zellkern eine dortige Wirkung auf die Regulierung der Transkription, Reparaturvorgänge an der *deoxyribonucleic acid* (DNA) und andere zelluläre Schutzmechanismen und Wachstumsvorgänge ausüben (Wang et al., 2010). Der zugrunde liegende Mechanismus und die Art, auf die der gesamte Rezeptor die volle Strecke von der Zelloberfläche zurücklegen und die Kernporenkomplexe passieren kann, sind noch unbekannt (Wang et al., 2010).

I. 2. 9. ErbB-Rezeptoren im nigrostriatalen System

Neuregulin1 bindet vornehmlich an ErbB3- und ErbB4-Rezeptoren (Olayioye et al., 2000; Linggi und Carpenter, 2006). Abe et al. (2009) untersuchten das Mittelhirn der Maus auf das Vorkommen aller vier ErbB-Rezeptoren. Eine starke Expression der mRNA von ErbB4 ließ sich während sämtlicher Entwicklungsstadien sowie im adulten Gehirn nachweisen und zeigte unter anderem eine starke Colokalisation mit den dopaminergen Neuronen in der Pars compacta der Substantia nigra. Eine dopaminerge ErbB3-Expression konnte nicht gefunden werden (Abe et al., 2009). Die Expression von ErbB1 mRNA erreichte im Mittelhirn nur ein niedriges Niveau und zeigte vor allem eine Signalüberlappung mit Markern für Gliazellen (Abe et al., 2009). Eine noch geringere Expression fand sich für die mRNA von ErbB2 (Abe et al., 2009).

Zusammenfassend steht einer Neuregulin1-induzierten ErbB-Rezeptoraktivierung an der dopaminergen Zelle der Pars compacta der Substantia nigra der Maus lediglich der ErbB4-Rezeptor zur Verfügung. Auch in der Substantia nigra von Affen und Mensch zeigt sich eine sehr starke ErbB4-Expression, die in der Pars compacta sogar höher ist als in der benachbarten Pars reticularis (Zheng et al., 2009).

I. 3. Zielsetzung der Arbeit

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurden funktionelle und histologische Effekte durch die intraperitoneale (i.p.) Administration der extrazellulären Domäne des Wachstumsfaktors Neuregulin1- β 1 in einem toxinbasierten Mausmodell des IPS untersucht.

In der Vergangenheit wurde bereits gezeigt, dass bei Ratten eine Neuregulin1- β Injektion in nigrale Nähe zu einer striatalen Dopaminfreisetzung führt (Yurek et al., 2004). Weiterhin konnte in einem Primärkulturmodell gezeigt werden, dass Neuregulin1 Typ II im Vergleich zu unbehandelten Kontrollzellen zu einer höheren Dopaminaufnahme in Zellen, einem vermehrten Aussprossen von Neuriten und einer höheren Zahl an dopaminergen Zellen führt. Letzteres konnte durch den immunhistochemischen Nachweis von Tyrosinhydroxylase (TH), nachgewiesen werden. Dieser Effekt kristallisierte sich auch in einem Vergleich von mit dem Neurotoxin 6-OHDA behandelten Zellen und unbehandelten Zellen heraus (Zhang et al., 2004).

Die vorliegende Arbeit stellt somit eine Versuchserweiterung und -kombination der von Yurek et al. und Zhang et al. durchgeführten Arbeiten dar, indem *in vivo* untersucht wurde, ob sich nach peripherer Neuregulinbehandlung ebenfalls neurotrophe oder neuroprotektive Effekte sowohl für die Substantia nigra als auch für das Corpus striatum nachweisen lassen unter Ergänzung durch ein Verhaltensexperiment, um etwaige strukturelle Effekte auf Verhaltensebene zu quantifizieren.

Im Rahmen der Untersuchungen der vorliegenden Dissertation erhielten die Tiere je nach Gruppenzugehörigkeit zunächst entweder eine rechtsseitige striatale Toxin- oder eine rechtsseitige striatale Placebo-Injektion.

Als Neurotoxin wurde 6-OHDA verwendet, welches mittels stereotaktischer Operation in das Corpus striatum injiziert wurde, was zu einer retrograden, fortschreitenden Degeneration der nigralen, dopaminergen Zellen führt (Alvarez-Fischer et al., 2008). Anschließend erfolgte entweder eine intraperitoneale Verabreichung von Neuregulin1- β 1 oder eine intraperitoneale Placebo-Injektion.

Im Rahmen ergänzender Arbeiten innerhalb der Arbeitsgruppe konnte parallel zu den Versuchen der vorliegenden Arbeit demonstriert werden, dass bei ausgewachsenen, gesunden Mäusen die systemische Verabreichung von Neuregulin1- β 1 sowohl den Dopamingehalt im ventralen Mittelhirn (194,7%) als auch im für die motorischen Funktionen des nigrostriatalen Pfades entscheidenden dorsalen Bereich des Corpus striatum (136,1%) steigert. Wenn die Neuregulin1- β 1-Verabreichung an fünf aufeinanderfolgenden Tagen erfolgte, zeigte sich darüber hinaus am 21. Tag eine um 16,7% gesteigerte Zellzahl in der Substantia nigra Pars compacta (Carlsson et al., 2011).

Auf funktionaler und histologischer Ebene sollten im Rahmen des hier verwendeten toxinbasierten Tiermodells folgende Fragen untersucht werden:

- Fällt das durch 6-OHDA verursachte und durch Amphetamin verstärkte motorische Rotationsverhalten der Mäuse unter dem Einfluss der Behandlung mit Neuregulin1- β 1 geringer aus?
- Ist die durch 6-OHDA verursachte Abnahme der striatalen Faserdichte unter dem Einfluss der Behandlung mit Neuregulin1- β 1 geringer?
- Ist das Ausmaß des durch die intrastriatale 6-OHDA-Injektion verursachten Zelltodes der dopaminergen Neurone in der Pars compacta der Substantia nigra unter dem Einfluss der Behandlung mit Neuregulin1- β 1 geringer?

II. Materialien und Methoden

II. 1. Mäuse

Als Versuchstiere wurden insgesamt 53 männliche 8 bis 10 Wochen alte C57BL/6 Wildtyp-Mäuse von der Charles-River Wiga Deutschland GmbH (Sulzfeld, Deutschland) bezogen und gemäß der Richtlinie des europäischen Rates 86/609/EEC für den Schutz von Tieren für experimentelle und andere wissenschaftliche Zwecke verwendet. Die Tierversuche wurden durch das Regierungspräsidium Gießen genehmigt (Nummer 29/2008) und nach § 8 Abs. 1 des Tierschutzgesetzes durchgeführt. Die Mäuse wurden in der Tierversuchshaltungseinrichtung im Biomedizinischen Forschungszentrum in der Hans-Meerwein-Straße, 35032 Marburg, in Käfigen zu fünf Tieren, mit freiem Zugang zu Wasser und Nahrung gehalten. In der Haltungseinrichtung herrschte eine Raumtemperatur von etwa 23°C, eine relative Luftfeuchtigkeit von 54% und ein zwölfstündiger Hell-Dunkel-Rhythmus, der Tag- und Nachtzeiten simulieren sollte. Der Tierversuch wurde nur zu Tageszeiten und erst nach einer siebentägigen Eingewöhnungszeit für die Tiere durchgeführt.

II. 2. Substanzen

Name	Herkunft
3,3'-Diaminobenzidin (DAB)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Riedstrasse 2, 89555 Steinheim
6-Hydroxydopamin	Sigma-Aldrich Chemie GmbH
Amphetamin	Sigma-Aldrich Chemie GmbH
Ascorbinsäure	Sigma-Aldrich Chemie GmbH
Avidin-Biotin-Komplex	Sigma-Aldrich Chemie GmbH
Eserserum / Normal Donkey Serum	Sigma-Aldrich Chemie GmbH
Ethanol	Sigma-Aldrich Chemie GmbH
Ketaminhydrochlorid	WDT (Wirtschaftsgenossenschaft deutscher Tierärzte eG), Siemensstr. 14, 30827 Garbsen
Kresylviolett-Azetat	Merck KGaA – Darmstadt, Frankfurter Str. 250, 64293 Darmstadt
Methanol	Sigma-Aldrich Chemie GmbH
NaCl	Sigma-Aldrich Chemie GmbH
Neuregulin (Nrg1β1-ECD)	377-HB/CF; R&D Systems, Minneapolis, MN
Paraformaldehyd (PFA)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH
Pentobarbital (Release®)	Merck KGaA
<i>Rabbit polyclonal anti-TH</i>	P40101-0, Pel-Freez Biologicals Arkansas LLC, 219 North Arkansas Street, Rogers, AR; 1/1000
Salzsäure	Sigma-Aldrich Chemie GmbH
Sekundärer Antikörper (<i>biotin-SP-conjug. Affini Pure Donkey anti-rabbit, 711-065-152</i>)	Dianova GmbH, Warburgstraße 45, 20354 Hamburg

Sucrose	Sigma-Aldrich Chemie GmbH
Triton X-100	Merck KGaA
Wasserstoffperoxid	Merck KGaA
Xylazinhydrochlorid 2% (Rompun®)	WDT
Xylol	Sigma-Aldrich Chemie GmbH

II. 3. Rezepte der selbsthergestellten Lösungen

6-OHDA-Lösung	5 µg 6-OHDA; 0,4 µg Ascorbinsäure; sterile 0,9%iger NaCl-Lösung (2 µL Gesamtvolumen)
<i>Antifreeze</i>	1,57 g NaH ₂ PO ₄ ; 5,18 g Na ₂ HPO ₄ ; 400 mL Aqua dest.; 300 mL Ethylenglycol; 300 mL Glycerin
DAB Gebrauchslösung	5 mg DAB Pulver in 10 mL PBS (s.u.)
Kresylviolett-Lösung	1 g Kresylviolett-Azetat in 100 mL A. dest.
<i>Phosphate buffer</i> (PB, dt. Phosphatpuffer), 0,1 molar, pH= 7,2	84 mL 0,2 molare PB (monobasisch); 216 mL 0,2 molare PB (dibasisch)
PB (dibasisch), 0,2 molar	14,2 g NaH ₂ PO ₄ in 500 mL Aqua dest.
PB (monobasisch), 0,2 molar	13,9 g Na ₂ HPO ₄ in 500 mL Aqua dest.
<i>Phosphate buffer saline</i> (PBS, dt. phosphatgepufferte Salzlösung), 0,1 molar	500 mL 0,1 molare PB; 3,5 g NaCl
PFA 8%	241,66 mL Aqua dest. (60°C); 20 mg PFA; 1-4 Tropfen 30% NaOH bis klare Lösung
Sucrose 30%	30 g Sucrose; 100 mL 0,1 molare PB
Triton-PB	300 µL Triton (= Octoxinol 9); 100 mL 0,1 molare PB

II. 4. Geräte

Canopus ADVC-50 Wandler	Canopus GmbH, Bergstraße 16-18, 56412 Ruppach-Goldhausen
Computer	AMD-Atlon 64 3200+ CPU FSB 1000, 1 GB
<i>Digital Lab Standard TM</i> Stereotaxie-System	Stoelting Co., Illinois, USA
Fixierbalken für den Ohrenbereich Model 921, Zygoma Ear Cups	Kopf, David Kopf Instruments, Tujunga, USA
Fixierbalken für den Schnauzenbereich Model 921-E Mouse Head Holder	Kopf, David Kopf Instruments
Infrarotlampe	Philipps Deutschland GmbH, Lübeckertordamm 5, 20099 Hamburg
Injektionsspritze für die intrathekale Injektion	Hamilton 701 RSN 10 µL, Hamilton Bonaduz AG, Bonaduz, Schweiz
Kamera im Offenfeldtest	VIDEO, B/W CCD CAMERA
Leica Kryostat CM 3050S	Leica Mikrosysteme Vertrieb GmbH, Ernst-Leitz-Straße 17, 35578 Wetzlar
<i>Micro Syringe Pump Controller</i> , Micro 4TM, Model UMC4	World Precicion Instruments, Sarasota, USA
Nikon Microphot EPI-FL 59831	Nikon GmbH, Tiefenbroicher Weg 25, 40472 Düsseldorf
Schüttelwasserbad	Otto E. Kobe KG
Stereotaxierahmen	Kopf, David Kopf Instruments
Zahnarztbohrer	Micromot 40/E+, NG 5/E, Proxxon, Niersbach, Deutschland

II. 5. Sonstige Materialien

Bepanthen®	Sigma-Aldrich Chemie GmbH
Betaisodona®	Sigma-Aldrich Chemie GmbH
Objektträger und Deckgläser	Otto E. Kobe KG, Fabrik für Labor- und Krankenhausbedarf
Operationsbesteck (Scheren, Pinzetten, Klammern, Dissektionsnadeln)	Bochem Instrumente GmbH, Industriestraße 3, 35781 Weilburg
Corbit	Merck KGaA
Bildauswertungs-Software	ImageJ v1.42, NIH, Bethesda, MD, USA
Software für Rotationsquantifizierung (Viewer II, rotation plug-in)	Biobserve GmbH, Königswinterer Straße 418, 53227 Bonn
Stereologiesystem	MicroBrightField Europe, E.K. Matthissonstrasse 6 39108 Magdeburg

II. 6. Versuchsablauf

Die Mäuse wurden per Zufall in fünf verschiedene Gruppen aufgeteilt. Alle Tiere wurden entweder einer unilateralen, rechtsseitigen striatalen 6-OHDA-Injektion oder einer Placebo-Injektion an identischen Injektionskoordinaten unterzogen. Anschließend wurde den Mäusen i.p. entweder Neuregulin1- β 1 oder NaCl (Placebo) appliziert. Dies geschah entweder sechs oder 48 Stunden postoperativ. Diese i.p. Behandlung wurde ab diesem Zeitpunkt alle 24 Stunden für die Dauer von weiteren sieben Tagen durchgeführt.

Die Operationen fanden an fünf verschiedenen Tagen statt, wobei an jedem Tag mehrere Tiere aus verschiedenen Gruppen operiert wurden. 24 Tage postoperativ wurde

das Amphetamin-induzierte Rotationsverhalten jedes einzelnen Tieres für 30 Minuten observiert, um die Funktion des nigrostriatalen Systems auf Verhaltensebene zu untersuchen. Vier Tage darauf wurden die Mäuse nach tiefer Analgosedierung transkardial perfundiert und die Gehirne entnommen, um diese anschließend histologisch aufzubereiten. Es wurden eine TH-Immunfärbung der Gehirnschnitte des Corpus striatum und der Substantia nigra sowie eine Kresylviolett-färbung der Schnitte der Substantia nigra durchgeführt. Anschließend wurde die optische Dichte der TH-immunreaktiven Fasern getrennt nach Gehirnhälfte für jedes Gehirn bestimmt. Mithilfe eines Stereologiesystems wurden unter dem Mikroskop die Neurone der Pars compacta der Substantia nigra ebenfalls seitengetrennt für jedes Gehirn quantifiziert. Dies erfolgte für beide vorgenommenen Färbungen.

II. 7. Stereotaktische Operation

Zuerst wurde die zu operierende Maus mit 6 mg pro kg Körpergewicht (mg/kg KG) Xylazinhydrochlorid und 100 mg/kg KG Ketaminhydrochlorid analgosediert. Die beiden Substanzen wurden zunächst im Verhältnis 1:4 mit steriler NaCl-Lösung gemischt und anschließend mit einer 1 mL Spritze und einer subcutan-Nadel in einem Winkel von etwa 45° oberhalb des linken Leistenbandes intraperitoneal verabreicht. Fünf Minuten nach der Injektion wurde die Narkosetiefe durch einen Schmerzreiz an der Hinterpfote der Maus überprüft. Im Allgemeinen hielt die Narkose 1 – 1,5 Stunden und war somit für die verschiedenen Operationen ausreichend, für die jeweils etwa 30 Minuten kalkuliert waren. Im Falle einer nicht ausreichenden Narkosetiefe wurde maximal die Hälfte der oben genannten Dosierung nachinjiziert.

Da Mäuse im bewussten Zustand nicht fähig sind, die Augen selbständig zu schließen, wurden die Augen möglichst rasch nach Einleitung der Anästhesie mit Bepanthen® Augensalbe bedeckt, um Schäden an den Augen durch Austrocknung zu verhindern. Die Kopfhare über der Eingriffsstelle wurden mit einer Schere entfernt und anschließend der Kopf der Maus in einem stereotaktischen Operationsrahmen zwischen zwei speziell für Mäuse entwickelten Fixierbalken für den Ohrenbereich und einem Kopfhalter für den Schnauzenbereich derart fixiert, dass die Schädeloberfläche parallel zur Horizontalebene ausgerichtet war. Die Kopfhaut wurde mit 70%igem Ethanol

desinfiziert, bevor sie mit einem Skalpell eröffnet wurde. Dies geschah durch einen sagittalen, etwa 1,5 cm großen Schnitt paramedian über dem vermuteten Bregma, welches als Kreuzungsstelle der Sutura coronalis mit der Sutura sagittalis des Schädeldachs definiert ist. Die Wundränder wurden durch 4 cm große, stumpfe Operationsklemmen unter leichtem Zug offen gehalten. Nach Identifizierung des Bregmas als Bezugspunkt wurden mithilfe des Displays des Stereotaxie-Systems, das elektrisch an eine an den Manipulatorarm des Stereotaxie-Systems befestigte Spritze gekoppelt war und die Koordinaten der aktuellen Position der Injektionskanüle der Spritze visualisierte, die anteroposterioren (AP = +0,9 mm) und die mediolateralen (ML = -1,8 mm) Koordinaten aufgesucht. Die Koordinaten wurden einem Mäusehirnatlas entnommen (Fanklin und Paxinos, 1997). Unter der nun positionierten Kanüle wurde mithilfe eines Zahnarztbohrers der Schädelknochen bis zum Sichtbarwerden der Dura mater trepaniert. Die Dura mater diente als Nullpunkt der dorsoventralen (DV) Achse, was in das Stereotaxie-System eingegeben wurde. Von der Dura mater aus wurde nun die Injektionskanüle langsam (3 mm/min) mithilfe einer manuellen Mikrometerschraube soweit abgesenkt, bis die Koordinate DV = -3,0 mm erreicht wurde.

Hier wurden den Mäusen je nach Gruppenzugehörigkeit entweder 2 μ L der 6-OHDA-Lösung injiziert, die in steriler 0,9%iger NaCl-Lösung 5 μ g 6-OHDA und 0,4 μ g Ascorbinsäure in 2 μ L Gesamtvolumen enthielt. Der Ascorbinsäurezusatz sollte einem vorzeitigen Wirkungsverlust des 6-OHDA durch Oxidation entgegenwirken. Den Mäusen der Kontrollgruppen wurden 2 μ L der NaCl-Ascorbinsäure-Trägersubstanz injiziert. Die Injektionen wurden jeweils durch eine elektrische Pumpe mit einer Injektionsgeschwindigkeit von 0,5 μ L/min vorgenommen. Die Injektionskanüle wurde bei sämtlichen Tieren für zehn Minuten an ihrer Position belassen, um die Diffusion der injizierten Lösung ins Gewebe zu fördern und ein Zurückfließen in den Stichkanal zu verhindern. Nun wurde die Kanüle langsam (3 mm/min) wieder aus dem Gehirn gezogen. Die Kopfhaut wurde mit drei bis vier Einzelknopfnähten verschlossen und auf die Wunde Bêtasodona® Salbe gegeben. Bis zum Aufwachen wurden die Mäuse mit einer Infrarotlampe vor Unterkühlung geschützt.

II. 8. Neuregulin1- β 1 Behandlung

Die Tiere, die im Rahmen der vorliegenden Arbeit einer Neuregulinbehandlung unterzogen wurden, erhielten je nach Gruppenzugehörigkeit 6 Stunden oder 48 Stunden postoperativ eine Injektionslösung bestehend aus Neuregulin1- β 1 und 0,9%iger steriler NaCl-Lösung (100 ng Neuregulin1- β 1 in 10 mL NaCl) über eine i.p. Injektion. Die Dosierung betrug 50 ng Neuregulin1- β 1/kg KG. Diese Dosis erhielten die Tiere alle 24 Stunden für weitere sieben Tage. Die Tiere der Vergleichsgruppen erhielten nach den gleichen zeitlichen Vorgaben – ebenfalls i.p. – ein identisches Volumen der sterilen NaCl-Lösung.

II. 9. Amphetamin-induziertes Rotationsverhalten im Offenfeld

1973 beobachteten von Voigtlander und Moore, dass Mäuse nach einseitiger striataler 6-OHDA Injektion ein einseitiges Rotationsverhalten aufweisen, das sich durch die Verabreichung von psychomotorischen Stimulantien verstärken lässt (von Voigtlander und Moore, 1973).

In dem im Rahmen der vorliegenden Arbeit durchgeführten Amphetamin-induzierten Rotations-Verhaltenstest wurde *in vivo* das Ausmaß der unilateralen nigrostriatalen dopaminergen Degeneration auf funktioneller Ebene quantifiziert. Es sollte überprüft werden, ob Tiere, die eine Neuregulin1- β 1 Behandlung im Anschluss an die Toxin-Injektion erhalten hatten, ein geringeres Rotationsverhalten aufweisen als die Tiere, die statt Neuregulin1- β 1 einen Placebo erhalten hatten.

Bei dem durchgeführten Versuch handelt es sich bis heute um einen häufig verwendeten Test bei Mäusen im Rahmen einseitiger Läsionsmodelle des IPS (Grealish et al., 2010).

Es wurden immer vier Tiere gleichzeitig untersucht. Diese erhielten i.p. jeweils eine Injektionslösung aus d-Amphetaminsulfat und 0,9%iger NaCl-Lösung (entsprechend 2,73 mg/kg KG d-Amphetaminsulfat). Üblicherweise werden Dosierungen zwischen 2 mg/kg KG und 10 mg/kg Kg im Rahmen von Rotationsverhaltenstests bei Mäusen gewählt (Grealish et al., 2010).

Direkt im Anschluss an die Verabreichung des Amphetamins wurden die Tiere separat in jeweils eine Offenfeld-Versuchsarena der Größe 50 cm (Breite) x 50 cm (Tiefe) x 40 cm (Höhe) gesetzt. Die Wände der Arenen waren weiß und die Bodenplatten

bestanden aus hellem Metall, sodass die dunklen Mäuse in dieser hellen Umgebung aufgrund des farblichen Unterschiedes gut auszumachen waren. Über den vier Arenen befand sich eine Beleuchtungseinrichtung in Form einer Milchglas-Streulichtscheibe und acht Glühlampen. Die Streulichtscheibe war über dem Mittelpunkt der quadratischen Gesamtfläche der vier Arenen installiert. Direkt darunter, ebenfalls mittig, war eine Kamera in 150 cm Abstand über den Bodenplatten angebracht. Die Kamera zeichnete die Bewegungen jeder einzelnen Maus in ihrer jeweiligen Arena für 30 Minuten auf. Die Daten wurden mithilfe eines Wandlers in einen Computer übertragen und durch eine spezielle Software im Hinblick auf das Rotationsverhalten der Tiere ausgewertet. Körperwendungen von jeweils 360° wurden als eine durchgeführte Rotation gewertet.

II. 10. Perfusion und Entnahme der Gehirne

28 Tage nach dem jeweiligen operativen Eingriff wurden die Gehirne der Mäuse entnommen. Um sie anschließend histologisch aufbereiten zu können, musste das Blut aus dem Hirngewebe ausgewaschen werden, da sonst eine zuverlässige histologische Anfärbung der im Verlauf zu untersuchenden Zellen nicht sichergestellt werden kann. Hierzu wurde die jeweilige Maus zunächst tief analgosediert. Die Wirkung wurde mithilfe eines Schmerzreizes an der Hinterpfote überprüft. Anschließend wurde die Maus mit ihrem Rücken auf das Gitterdach eines leeren Mäusekäfigs gelegt und fixiert, um in dem Käfig das Blut und die Perfusionssubstanzen auffangen zu können. Mit einer scharfen Schere erfolgte die Thorakotomie und Durchtrennung des Zwerchfells, um Aufsicht auf das Herz der Maus zu erhalten. Das rechte Atrium wurde inzidiert und eine Kanüle, die an die Schlauchquetsch-Perfusionspumpe angeschlossen war, über den apikalen Bereich des Herzens in den linken Ventrikel eingeführt. Die Pumpe beförderte in drei Minuten 50 mL 0,01 molare eisgekühlte phosphatgepufferte Salzlösung (PBS-Lösung) durch das Blutgefäßsystem der Maus. Blut und PBS-Lösung verließen den Kreislauf durch den eröffneten rechten Vorhof. Nachdem die Zeit verstrichen und überprüft worden war, dass sich die Pfoten der Maus infolge der Blutleere weiß verfärbt hatten, wurde das Pumpsystem nun mit einer Lösung von 4% Paraformaldehyd (PFA) in 0,1 molarem Phosphatpuffer (PB) gefüllt und die Perfusion für weitere 10 Minuten fortgesetzt, um das Gewebe zu fixieren. Die fixierende Wirkung wurde während des

Perfusionsvorgangs optisch durch einen generalisierten Kontraktionsprozess der Skelettmuskulatur verifiziert. Nachdem die Perfusion beendet war, wurde zügig der Kopf der Maus mit einer großen Schere abgetrennt und rasch die Weichteile im oberen Bereich des Schädels per Hand stumpf entfernt. Der Schädelknochen wurde beidseitig möglichst lateral mit einer kleinen Schere aufgespalten. Es folgte ein möglichst weit rostral gelegener Verbindungsschnitt in koronarer Richtung. Das Schädeldach wurde abgehoben und mit einem kleinen Spatel das Gehirn sorgsam entnommen. Für die nächsten 24 Stunden wurde es bei 4°C in der 4%igen PFA-Lösung immersionsnachfixiert. Zur Kryoprotektion wurde das Gehirn im Anschluss zweimal für 24 Stunden in eine 30%ige Sucroselösung auf der Basis von 0,1 molarer PB-Lösung bei einer Raumtemperatur von 4°C gelagert.

II. 11. Mikrotomie

Von den Mäusegehirnen wurden bei -20°C in der koronaren Ebene 35 µm dicke Schnitte mithilfe eines Gefriermikrotoms angefertigt. Im Kortex des jeweiligen Gehirns wurde auf der linken Seite eine punktförmige Markierung als spätere Identifikationshilfe der nicht-operierten Seite mit einer Nadel gesetzt. Der Schneidevorgang wurde am Bulbus olfactorius begonnen und bei Erreichen des Kleinhirns beendet. Die Schnitte wurden in zehn äquidistanten Serien gesammelt und anschließend bei -20°C in einer Antifreeze-Lösung gelagert.

II. 12. Tyrosinhydroxylase-Immunfärbung

Tyrosinhydroxylase (TH) ist das geschwindigkeitsbestimmende Enzym der Dopaminsynthese (Pickel et al., 1975). Die im Rahmen der vorliegenden Arbeit histologisch untersuchten Strukturen (Substantia nigra und Corpus striatum) besitzen TH-Immunreaktivität (Waters et al., 1988, Burke et al., 1990).

Die TH-Immunfärbung wurde von zwei Schnittserien der Mäusegehirne angefertigt, sodass die nicht-gefärbten Abstände zwischen den einzelnen Schnitten 140 µm betrugen. Als Erstes wurde die Antifreeze-Lösung durch dreimaliges zehnminütiges Waschen auf einem Schüttelwasserbad in 0,1 molarer PB-Lösung entfernt. (Die folgenden Waschschrte werden in analoger Weise durchgeführt). Im Anschluss wurde eine Lösung aus Methanol, 30%igem Wasserstoffperoxid und 0,1 molarer PB-Lösung mit einem Mischungsverhältnis von 1:1:8 auf die Gehirnschnitte gegeben. Diese Lösung verhinderte eine Anfärbung unerwünschter Strukturen durch eine Inhibition des gewebeeigenen Enzyms Peroxidase, da dieses ungehemmt eine unspezifische Reaktion mit dem im Folgenden eingesetzten Diaminobenzidin (DAB) eingehen kann. Darauf folgte ein weiterer Waschvorgang. Die sich anschließende 60minütige Präinkubation mit Eselserum in Triton-PB-Lösung mit einem Mischungsverhältnis von 1:20 verhinderte unspezifische Reaktionen des im nächsten Schritt verwendeten Primärantikörpers. Dieser wurde direkt im Anschluss in einer Verdünnung von 1:1000 mit einer neu angesetzten Lösung aus Eselserum in Triton-PB-Lösung mit dem gleichen Mischungsverhältnis wie im vorangegangenen Schritt auf die Schnitte gegeben. Ziel war die Bindung des Primärantikörpers an das Enzym TH. Das beigefügte Triton führte zu einer Permeabilisierung der Zellmembran und somit zu einer Verbesserung der Penetration des Antikörpers.

Während alle bisherigen Schritte bei Raumtemperatur durchgeführt wurden, erfolgte die Inkubation des primären Antikörpers bei 4°C über Nacht (mindestens 14 Stunden). Um die ungebundenen Antikörper zu entfernen, folgte ein weiterer Waschvorgang, der bei Raumtemperatur durchgeführt wurde. Anschließend folgte die 60minütige Inkubation mit dem biotinylierten Sekundärantikörper in einer Verdünnung von 1:250 in der bereits genannten Eselserum-Triton-PB-Lösung. Der sekundäre Antikörper geht eine Bindung mit dem Fc-Teil des TH-assoziierten primären Antikörpers ein. Durch einen weiteren Waschvorgang wurden die ungebundenen sekundären Antikörper entfernt und

anschließend das Avidin-Biotin-Complex-Kit (ABC-Kit) in einer jeweiligen Verdünnung von 1:200 in 0,1 molarer PB-Lösung für 60 Minuten auf die Gehirnschnitte gegeben. Das ABC-Kit besteht aus Avidin und besitzt Peroxidaseaktivität. Avidin verfügt über eine hohe Biotinaffinität und wirkt somit auch auf den biotinylierten sekundären Antikörper affin. Die assoziierte Peroxidaseaktivität ist für den farbgebenden Schritt der TH-Färbung entscheidend. Dieser wurde, nachdem ein weiterer Waschvorgang durchgeführt worden war, durch die Zugabe einer Mischung aus DAB, 0,1 molarer PB-Lösung und 1%iger Wasserstoffperoxidlösung durchgeführt. Die Farbreaktion startet erst bei Zugabe der Wasserstoffperoxidlösung und beruht darauf, dass DAB als ein Substrat der Peroxidase zu einem Komplex umgesetzt wird, welches Licht im braunen Spektralbereich reflektiert. Ein letzter Waschvorgang wurde durchgeführt, bevor die Schnitte in eine mit 0,9%iger NaCl-Lösung gefüllte Petrischale von 20 cm Durchmesser gegeben wurden, um die einzelnen Schnitte zu sortieren und auf gelatinierte Objektträger aufzuziehen. Nachdem die Objektträger getrocknet waren, wurden die Schnitte in drei Alkohollösungen aufsteigender Konzentration dehydriert. Hierzu wurde zunächst 70%ige Ethanol-Lösung, dann 96%ige – jeweils mit Aqua dest. verdünnt – und anschließend 100%iger Ethanol verwendet. Zuletzt wurden die Schnitte in Xylol entspiritisiert, bevor sie mit Corbit eingedeckelt wurden.

II. 13. Kresylviolett-Färbung nach Nissl

Für die Kresylviolett-Färbung nach Nissl mussten zuerst die nativen Gehirnschnitte aufgezogen werden. Anschließend wurden sie bei Raumtemperaturbedingungen für etwa 30 Minuten getrocknet. Es wurden, wie bei der TH-Immunfärbung beschrieben, zwei Schnittserien mit dem oben genannten Abstand zwischen den einzelnen Gehirnschnitten gewählt. Daraufhin wurden die Schnitte für etwa fünf Minuten in der Kresylviolett-Lösung (siehe Kapitel II. 3.) gefärbt. Nach ausreichender Farbgebung wurden die Objektträger etwa viermal in Aqua dest. getaucht. Im Anschluss wurden sie zur Kontrastierung und Dehydrierung für zwei bis drei Minuten in eine 90%ige Ethanol-Lösung in Aqua dest. mit wenigen Tropfen Eisessig gelegt. Im nächsten Schritt erfolgte ein kurzzeitiges Spülen mit Aqua dest.. Daraufhin folgte eine Dehydrierung für jeweils fünf Minuten in zunächst einer Ethanol-Lösung von 70% in Aqua dest., anschließend in 96% und daraufhin in 100%iger Ethanol-Lösung. Zuletzt wurden die

Schnitte in eine reine (100%) Xylollösung getaucht. Zum Schutz wurden auch diese Objektträger mit Corbit und einem Deckglas versehen.

II. 14. Densitometrie

Die optische Dichte der TH-immunreaktiven Fasern des Corpus striatum repräsentiert die striatale dopaminerge Innervation. Wie oben erwähnt stellt TH das geschwindigkeitsbestimmende Enzym der Dopaminsynthese dar. Mithilfe der Densitometrie wurde die 6-OHDA-induzierte striatale dopaminerge Denervation quantifiziert.

Die optische Dichte der striatalen TH-immunreaktiven Fasern wurde in sieben schwarz-weiß bei konstanter Blende und Belichtungszeit fotografierten Schnitten in äquidistanten Abständen eines definierten Bereichs (1,7 mm vor bis 0,5 mm hinter dem Bregma auf der sagittalen Achse) bestimmt. Den Mäusegehirnen waren zuvor von einer im Verlauf nicht weiter beteiligten Person per Zufallsprinzip Zahlen zugeordnet worden, die erst nach Auswertung sämtlicher Daten decodiert wurden. Mithilfe einer Bildauswertungs-Software wurde jeder einzelne Schnitt vergrößert und anschließend seitengetrennt das Corpus striatum mit dem Mauszeiger umfahren und markiert, um den relevanten Bereich für die spätere Bearbeitung mit der Software abzugrenzen und seine Größe zu bestimmen. Burke et al. beschrieben im Jahre 1990 diese Methode im Rahmen eines Versuchs mit Ratten. Die Autoren hatten wie in der vorliegenden Arbeit den nigralen dopaminergen Zelluntergang durch nigrale 6-OHDA-Injektion verursacht und immunhistochemische TH-Färbung zur Darstellung des Corpus striatum verwendet (Burke et. al 1990).

Die anatomischen Grenzen des Corpus striatum wurden dem Mäusehirnatlas entnommen (Franklin und Paxinos, 1997). Die entstandene Kontur wurde abgespeichert und deren Größe sowie der minimale, maximale und durchschnittliche Grauwert innerhalb der Kontur als Korrelat für die optische Dichte von der Bildauswertungs-Software errechnet. Dies wurde seitengetrennt für den jeweils links- und rechtshirnigen striatalen Schnitt durchgeführt, bevor mit dem nächsten Schnitt fortgefahren wurde. Die gesamte mittlere optische Dichte aller einzelnen Schnitte eines Corpus striatum wurde bestimmt aus dem Mittel der optischen Dichten der sieben gemessenen Schnitte,

gewichtet nach der jeweiligen Querschnittsfläche des Corpus striatum auf dem jeweiligen Schnitt. Hierzu wurde folgende Formel verwendet:

$$OD = \sum_{i=1}^7 \frac{Ai}{\sum_{i=1}^7 Ai} * OD_i$$

OD = Optische Dichte auf dem Schnitt i eines Corpus striatum einer Hirnhälfte,

Ai = Querschnittsfläche des Corpus striatum einer Hirnhälfte,

ODi = Optische Dichte des Corpus striatum einer Hirnhälfte auf dem Schnitt i

$\frac{Ai}{\sum_{i=1}^7 Ai}$ gewichtet in der oben stehenden Summe die optische Dichte des Corpus striatum einer Hirnhälfte auf dem Schnitt i anhand der von der Software berechneten jeweiligen Querschnittsfläche. Dazu werden die Querschnittsflächen des Corpus striatum im Nenner des Bruches mit einer weiteren Summe aller Querschnittsflächen des Corpus striatum von n = 1 bis n = 7 gewichtet.

Der Wert der optischen Dichte des operationsseitigen Corpus striatum eines jeden Tieres wurde ausgedrückt als prozentualer Anteil des Wertes der nicht-operierten Seite desselben Tieres.

II. 15. Stereologie

Stereologie ist ein multidisziplinärer wissenschaftlicher Bereich, der ermöglicht, aus realen dreidimensionalen Strukturen über zweidimensionale Darstellung quantitative Informationen zu erhalten (Altunkaynak et al., 2012). Auf diese Weise wurde in der vorliegenden Arbeit der numerische Zellgehalt der Substantia nigra pars compacta bestimmt.

Zuerst erfolgte eine Verblindung der TH-gefärbten sowie der Kresylviolett-gefärbten nigralen Schnitte durch eine unabhängige Person. Untersucht wurde jeder fünfte Schnitt aller angefertigten Schnitte der Substantia nigra mithilfe der *Optical Fractionator* Methode eines Stereologiesystems (Näheres siehe folgendes Kapitel). Auf einem

Monitor eines Computers, an den eine Kamera angeschlossen war, wurden die unter dem Mikroskop liegenden Schnitte dargestellt. Unter Hinzuziehen des Mäusehirnatlas wurden der auszuzählende Bereich, die *region of interest* (ROI), in rostral-caudaler Achse (2,4 mm bis 4,1 mm caudal des Bregmas nach Franklin und Paxinos, 1997) sowie die Grenzen der Pars compacta der Substantia nigra manuell mit dem Mauszeiger in den einzelnen Schnitten definiert. Mithilfe des Stereologiesystems wurden die seitengetrennten Anzahlen der TH-gefärbten Neurone der Pars compacta der Substantia nigra bestimmt. Zunächst wurde durch das Stereologiesystem die ROI in ein aus Quadern bestehendes dreidimensionales Gitternetz unterteilt. In jedem einzelnen Quader mit einem Volumen von $787500 \mu\text{m}^3$ befand sich ein ebenfalls quaderförmiger dreidimensionaler Zählraum, der mit einem Volumen von $196875 \mu\text{m}^3$ einem Viertel des Volumens eines Gitternetzquaders entsprach. Der Monitor visualisierte den dreidimensionalen Zählraum in Form einer zweidimensionalen Zählfläche (x mal y) und einem z-Meter. Die Zählfläche wurde von zwei grünen Linien (oben und rechts) sowie von zwei roten Linien (unten und links) begrenzt. Gezählt wurde mit einer 40fachen Vergrößerung unter Verwendung eines Ölimmersionsobjektivs. Nicht gezählt wurden die Zellen, die mit ihrem Zellkörper zumindest eine der roten Linien berührten. Auf diese Weise wurden Rechenfehler in der Hochrechnung auf die Gesamtzahl der Zellen vermieden (Näheres siehe folgendes Kapitel). Die Position des Zeigers auf dem z-Meter gab an, in welcher Höhe auf der Tiefenachse sich die fokussierte Ebene befand. Diese war durch Auf- und Abscrollen mit dem Mausexplorer veränderbar. Es gab einen grünen und zwei randgelegene rote Bereiche auf dem z-Meter. Gezählt wurden nur diejenigen Zellen, die im grünen Bereich fokussierbar waren und bestimmte morphologische Kriterien erfüllten. Es musste sich um eine runde, polygonal-geformte Zelle mit Neuriten und deutlich erkennbar braun gefärbten, schmalen Zytoplasma und hellem, großem Nucleus handeln. Die rostral gelegene Zelloberfläche musste sich im grünen Bereich darstellen lassen. Ein Zählareal wurde auf dem verwendeten Monitor vollständig abgebildet und nach Beendigung der Auszählung innerhalb eines Zählareals wurde automatisch das nächstauszählende Areal auf dem Monitor visualisiert.

Die Zählungen in den einzelnen Konturen der verschiedenen Schnitte wurden getrennt in einer gemeinsamen Datei für die jeweilige Hirnhälfte abgespeichert. Das Stereologiesystem errechnete aus der gezählten Zellzahl die Gesamtzahl der Zellen für eine Gehirnhälfte (Näheres siehe folgendes Kapitel). Der Mittelwert des

Fehlerkoeffizienten nach Scheaffer lag bei 0,09465. Die Einzelwerte lagen zwischen 0,078851 und 0,13969. Die Erläuterung des verwendeten Fehlerquotienten ist Bestandteil des folgenden Kapitels.

II. 16. *Optical Fractionator Methode*

Um eine präzise Aussage bezüglich des Zellgehalts einer anatomischen Struktur zu erhalten, ist eine Reihe von Störfaktoren auszuschließen, die bei Zellzählungen auftreten können.

So ist es beispielsweise nicht zielführend, schlichtweg alle Zellen aller angefertigten histologischen Schnitte einer anatomischen Struktur auszuzählen. Hierzu folgendes Bildbeispiel:

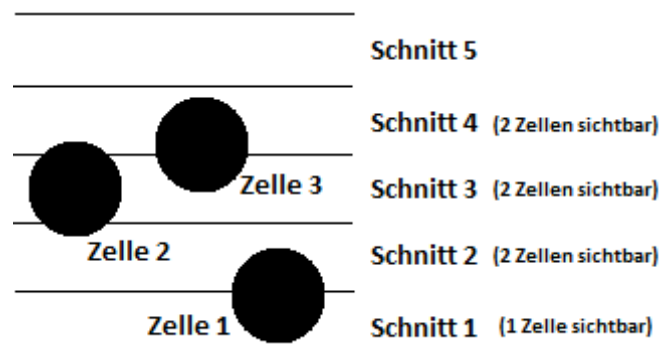


Abbildung 6) Die Auszählung der einzelnen Schnitte ergibt eine falsch hohe Gesamtzahl (7 Zellen).

Würden in jedem der schematisch dargestellten einzelnen fünf Schnitte (Abbildung 6) jeweils alle sichtbaren Zellen gezählt, ergäbe sich eine Gesamtzahl von 7 Zellen, was einer falsch-hoch bestimmten Summe entspricht und in diesem Beispiel Resultat sowohl einer zu klein gewählten Schnittdicke als auch der unumgehbaren Möglichkeit ist, dass sich eine Zelle genau auf der Schnittkante befinden kann.

Es sollte also eine ausreichende Schnittdicke gewählt werden und insbesondere auch ein ausreichender Abstand zwischen den auszuzählenden Schnitten liegen, um derartige Mehrfachzählungen zu vermeiden.

Darüber hinaus gilt zu beachten, dass auch die unterschiedliche Größe der Zellen einen falschen Zahlenwert hervorrufen kann.

Hierzu folgendes Bildbeispiel:

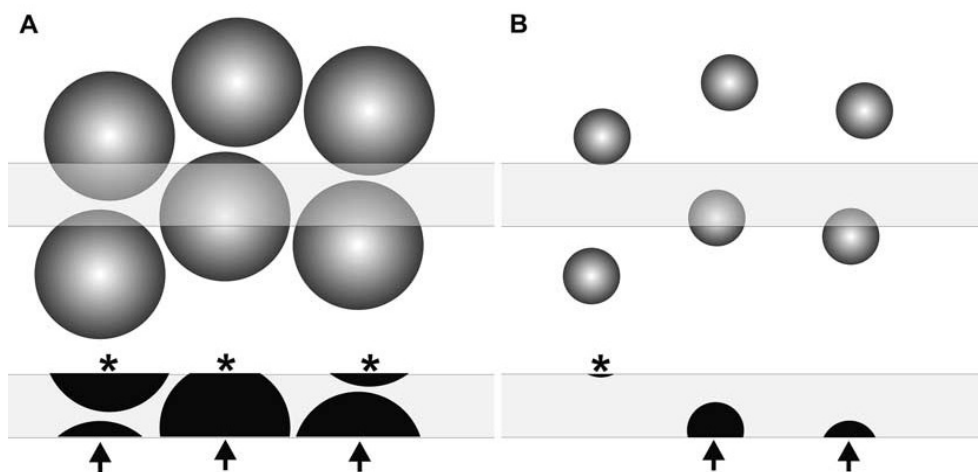


Abbildung 7) Der Einfluss der Größe von Zellen bei der Hochrechnung auf die Gesamtzahl an Zellen einer anatomischen Struktur.

Abbildung übernommen von Schmitz und Hof, 2005

In Abbildung 7 werden zwar in Abgrenzung zum ersten Bildbeispiel dieses Kapitels (Abbildung 6) nur Zellen in dem grau unterlegten Bereich gezählt, sodass zumindest keine schnittkantenbedingten Mehrfachzählungen durch Vorhandensein von Zellanteilen in mehreren Schnitten vorkommen können, dennoch ergibt sich in Beispiel A eine Zellzahl von fünf und in Beispiel B eine Zellzahl von drei, was (bei absolut identischer Gesamtzahl) aufgrund der unterschiedlichen Größe zu einem unterschiedlichen Ergebnis bei einer Hochrechnung führt.

Weiterhin können Form und Orientierung von Zellen zu Fehlbestimmungen führen:

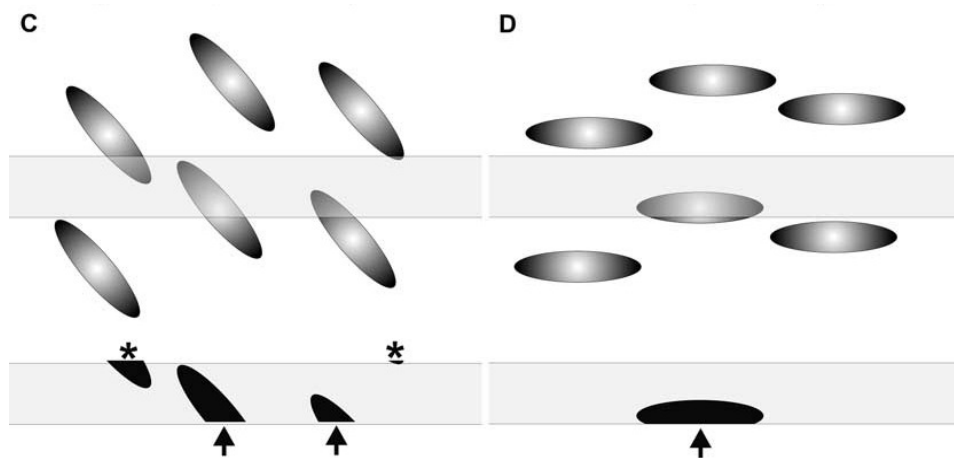


Abbildung 8) Der Einfluss der Form und Orientierung von Zellen bei der Hochrechnung auf die Gesamtzahl an Zellen einer anatomischen Struktur.

Abbildung übernommen von Schmitz und Hof, 2005

In Bildbeispiel C der Abbildung 8 ergeben sich drei Zellen, in Bildbeispiel D ergibt sich lediglich eine Zelle.

Ebenso kann die Verteilung von Zellen in einer anatomischen Struktur zu falschen Ergebnissen führen:

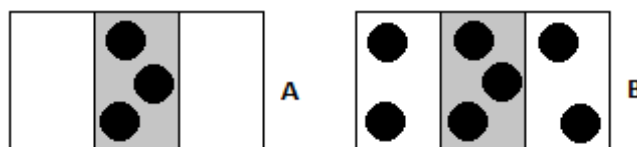


Abbildung 9)

Auch in Abbildung 9 kann man jeweils nicht ohne weiteres aus den jeweiligen Zellzahlen innerhalb des grauen Rechtecks (als Zählareal) Rückschlüsse auf die Gesamtzahl ziehen.

Mithilfe des bereits im vorherigen Kapitel erwähnten Stereologieprogramms *Optical Fractionator* können die genannten möglichen Fehlerquellen durch Zellgröße, Zellform und Orientierung der Zellen umgangen werden und es ist nicht notwendig, Annahmen über die Verteilung der Zellen aufzustellen (West, 2001).

Das im vorherigen Kapitel beschriebene Procedere der Zellzählung in ausschließlich den grün markierten Bereichen innerhalb eines jeden quaderförmigen dreidimensionalen Zählraums unter Berücksichtigung einer durch das Stereologiesystem gewährleisteten zufälligen Verteilung des Gitternetzes und der dreidimensionalen Zählräume bei ebenfalls zufällig ausgewähltem Beginn des Intervalls der verwendeten Schnitte (jeder fünfte bei insgesamt zehn Schnittserien) kennzeichnet das Prinzip der *Optical Fractionator* Methode, was durch folgendes Bildbeispiel (hier anhand des Corpus striatum) veranschaulicht werden kann:

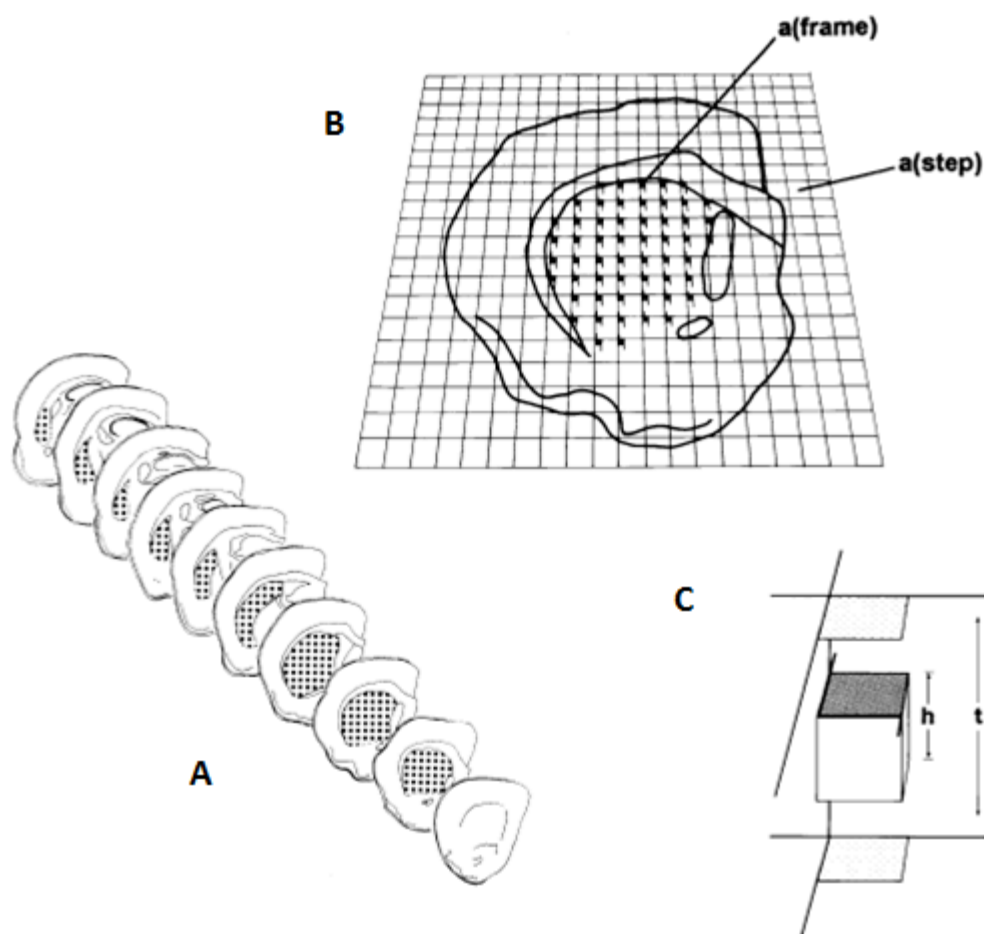


Abbildung 10) Eine vereinfachte Darstellung zum Verständnis des Prinzips der *Optical Fractionator* Methode. Erläuterung im Text.

Abbildung übernommen von West, 2001

A: Eine zufällig gewählte Schnittserie mit definiertem Abstand zwischen den einzelnen Schnitten, die die gesamte Länge der ROI in rostral-caudaler Achse durchspannt, gewährleistet, dass in dieser Achse jeder Bereich des Striatums mit derselben Wahrscheinlichkeit als auszuzählender Bereich festgelegt werden kann. Im Folgenden

wird die Anzahl der ausgewählten Schnitte als *section sampling fraction* (ssf) bezeichnet.

B: Vereinfachte Darstellung des in Wirklichkeit dreidimensionalen Gitternetzes (Inhalt weiß), und den darin enthaltenen dreidimensionalen schwarz dargestellten Zählarealen (siehe C), die jeweils ein definiertes Volumen besitzen. Der Quotient $a(step)/a(frame)$ (asf) teilt die jeweilige Fläche eines weißen Rechtecks durch die schwarz dargestellte Fläche (auszuzählender Bereich).

C: t = Dicke des Schnittes = auf dem in Kapitel II.15 erklärten z-Meter die Summe aus rot und grün dargestellten Bereichen; h = Höhe des dreidimensionalen Zählbereichs (auf dem z-Meter grün dargestellt). Die Summe aller gezählten Zellen innerhalb aller Zählbereiche wird im Folgenden als $\sum Q$ bezeichnet.

Die Hochrechnung auf die Gesamtzahl der Zellen der ROI (= est N) erfolgt über folgende Berechnung: $est\ N = \sum Q \cdot 1/ssf \cdot 1/asf \cdot t/h$. In der vorliegenden Arbeit ist $est\ N$ = die Gesamtzahl an Zellen der Substantia nigra pars compacta einer Hirnhälfte.

Erläuterung des verwendeten Fehlerkoeffizienten nach Scheaffer

Wie bereits im Kapitel II. 15. Stereologie erwähnt, erfolgte im Rahmen der stereologischen Auswertung eine Bestimmung des Fehlerquotienten nach Scheaffer (SMO CE). Ein Fehlerquotient (CE) dient im Zusammenhang mit stereologischen Berechnungen der Bemessung, wie präzise eine Fractionator-basierte Quantifizierung erfolgt (Glaser und Wilson, 1998).

Glaser und Wilson untersuchten 1998 drei verschiedene Möglichkeiten zur Bestimmung des Fehlerkoeffizienten bei Anwendung der *Optical Fractionator* Methode anhand einer simulierten Population, deren Gesamtzahl bekannt war. Ebenso war der wahre Fehlerkoeffizient bekannt. Sie konnten zeigen, dass der in der hier vorliegenden Arbeit verwendete Fehlerkoeffizient nach Scheaffer am Besten geeignet war. Hierbei handelt es sich nicht um einen rein für Stereologie verwendeten Fehlerkoeffizienten (Glaser und Wilson, 1998).

Der wahre Fehlerkoeffizient ist der Quotient aus der Standardabweichung, definiert als Quadratwurzel der Varianz (Var) und der wahren Zellzahl (N), wobei \hat{N} der Schätzwert der wahren Zellzahl ist:

$$CE(\hat{N}) = [Var(\hat{N})]^{1/2} / N$$

Es gilt: Je kleiner der Wert für die Standardabweichung ist, desto genauer ist eine Messung erfolgt. Mit zunehmender Größe von N , wird der Fehlerkoeffizient kleiner. Somit steigt mit sinkendem Fehlerkoeffizienten die Genauigkeit der Hochrechnung auf die Gesamtzahl der Zellen anhand der gezählten Zellen über die Optical Fractionator Methode.

Der Fehlerkoeffizient nach Scheaffer bezieht folgende Größen in die Berechnung mit ein:

Die bestimmte mittlere Zellzahl:

$$mean: \bar{Q} = \frac{\sum_{m=1}^f \bar{Q}_m}{f}$$

und die Varianz:

$$variance: s^2 = \frac{\sum_{m=1}^f (Q_m - \bar{Q})^2}{f - 1}$$

Wobei in beiden Formeln Q_m die Zellzahl auf dem Schnitt m ist und f die Gesamtzahl aller Schnitte während eines gesamten Zählvorgangs einer ROI.

Die Varianz der mittleren Zellzahl pro Disektor ist $fpc \cdot s/f$, wobei fpc die begrenzt berichtete Größe für die bestimmte Gesamtzahl an Zellen ist, welche berechnet wird über $[(F - f) / F]$. F ist hierbei die Gesamtzahl an Schnitten und bekannt in dem Setting von Glaser und Wilson, normalerweise aber unbekannt.

Folgende Näherung gilt für den verwendeten Fehlerquotienten:

$$CE = \sqrt{[1/f - 1/F] \cdot (s/\bar{Q})}$$

Wenn die statistischen Merkmale einer Population auf eine Poisson Verteilung hinweisen, kann unter der Annahme, dass sich S/Q an $1/Q$ für große f folgende Vereinfachung formulieren:

$$SMO\ CE \approx 1/\sqrt{Q_T}$$

II. 17. Statistik

Die Ergebnisse werden als Mittelwert \pm Standardfehler des Mittelwerts, engl. *standard error of mean* (SEM) angegeben. Ausgehend von der Annahme, dass der Standardfehler eine Messgröße für den Durchschnittswert der Abweichungen zwischen wahrem und geschätztem Wert ist, wird der Standardfehler des Mittelwertes berechnet als Standardabweichung der Schätzfunktion, also aus der Wurzel der Varianz. Die Varianzanalyse bei Gruppenvergleichen wurde mithilfe des *analysis of variance* (ANOVA)-Test, gefolgt vom *post-hoc Fisher least significant difference* (LSD)-Test durchgeführt. Hierdurch sollen im Rahmen der vorliegenden Arbeit die Ergebnisse der einzelnen Gruppen im Hinblick auf die Varianz innerhalb der jeweiligen einzelnen Gruppe und im Hinblick auf die Varianz zwischen den Gruppen untereinander verglichen werden. Wahrscheinlichkeiten von $p < 0,05$ wurden als statistisch signifikant gewertet.

Mit den Prüfgrößen des Verfahrens wird getestet, ob die Varianz zwischen den Gruppen größer ist als die Varianz innerhalb der Gruppen. Dadurch kann ermittelt werden, ob sich die Gruppen signifikant unterscheiden oder nicht. Der ANOVA-Test wird statistisch benutzt, um bei einer Varianzanalyse zu beobachten, ob sich verschiedene unabhängige Stichproben hinsichtlich einer Variable in der Ordinalskala unterscheiden.

III. Ergebnisse

Wie bereits in Kapitel II.6 dargelegt, wurden vor Beginn der Untersuchungen der vorliegenden Arbeit per Zufallsprinzip die Versuchstiere in fünf Versuchsgruppen eingeteilt und entweder einer rechtsseitigen striatalen 6-OHDA-Injektion oder einer NaCl-Injektion (Plazebo) unterzogen. Anschließend wurden die Mäuse für sieben Tage, (beginnend entweder sechs oder 48 Stunden nach der Operation) mit Neuregulin1- β 1 oder mit NaCl (Plazebo – beginnend sechs Stunden nach der Operation) intraperitoneal behandelt.

Somit lassen sich folgende Versuchsgruppen auflisten:

- **P – P** : NaCl-Injektion – NaCl-Behandlung
 (10 Tiere)
- **P – N** : NaCl-Injektion – Neuregulin-Behandlung
 (12 Tiere)
- **6 – P** : 6-OHDA-Injektion – NaCl-Behandlung
 (10 Tiere)
- **6 – N** : 6-OHDA-Injektion – Neuregulin-Behandlung
 (10 Tiere)
- **6 – vN**: 6-OHDA-Injektion – verzögerte Neuregulin Behandlung
 (11 Tiere)

Die einzelnen Tiere wurden zunächst im Hinblick auf ihr Amphetamin-induziertes Rotationsverhalten untersucht. Nach Tötung der Tiere und Anfertigung einer striatalen und nigralen TH-Immunfärbung sowie einer Kresylviolett-färbung der Schnitte der Substantia nigra, wurde die optische Dichte der striatalen TH-immunreaktiven Fasern getrennt nach Gehirnhälfte für jedes einzelne Tier bestimmt und (ebenfalls für jedes einzelne Tier) nach Hirnhälfte getrennte Zellzählungen anhand der nigralen Schnitte durchgeführt.

III. 1. Neuregulin1- β 1 schützt vor 6-OHDA-induziertem Rotationsverhalten

Eine striatale Injektion von 5 μ g 6-OHDA induzierte bei Kontrolltieren der Gruppe 6 – P ein Amphetamin-induziertes Rotationsverhalten zur lädierten Seite von $2,4 \pm 0,6$ Umdrehungen pro Minute. Für Tiere, die eine sechs Stunden postoperativ beginnende Neuregulin1- β 1 Behandlung erhielten, wurden lediglich $1,1 \pm 0,6$ Umdrehungen zur lädierten Seite gemessen. Eine 48 Stunden postoperativ einsetzende Neuregulin1- β 1 Behandlung führte im Vergleich zur Gruppe 6 – P zu einer nicht-signifikanten Reduktion auf $1,9 \pm 0,4$ Umdrehungen pro Minute. Die Tiere, die eine Plazeboläsion mittels NaCl-Injektion erhalten hatten, zeigten Rotationswerte zur Operationsseite von $0,4 \pm 0,2$ bei nachfolgender Plazebo-Behandlung mit NaCl und Rotationswerte entgegen der Operationsseite von $0,3 \pm 0,4$ bei nachfolgender Neuregulin1- β 1 Behandlung. Diese Ergebnisse sowie die statistische Auswertung sind im Folgenden tabellarisch und graphisch in Abbildung 11 dargestellt.

	Amphetamin-induzierte Rotationen zur Operationsseite pro Minute *	Standardfehler
Gruppe P - P	0,4	0,2
Gruppe P - N	-0,3	0,4
Gruppe 6 - P	2,4	0,6
Gruppe 6 - N	1,1	0,6
Gruppe 6 - vN	1,9	0,4

* Rotationen entgegen der Operationsseite sind durch ein negatives Vorzeichen gekennzeichnet.

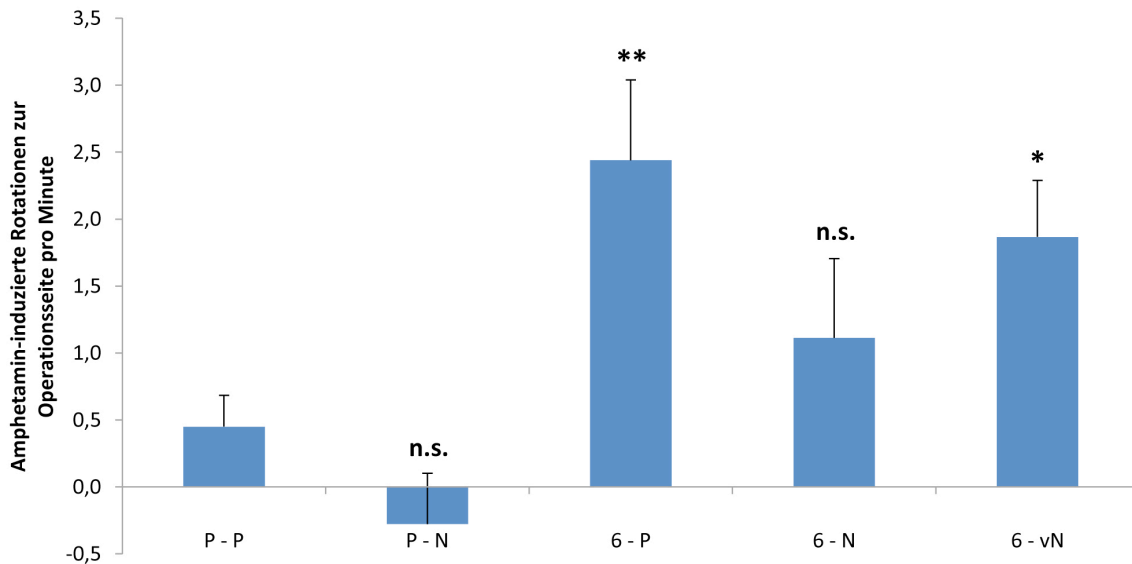


Abbildung 11) n.s. = nicht signifikant gegenüber P – P, $p > 0,05$; ** = $p < 0,01$ gegenüber P – P; * = $p < 0,05$ gegenüber P – P

III. 2. Neuregulin1- β 1 schützt vor 6-OHDA-induziertem striatalen Faserverlust

Die optische Dichte der TH-immunreaktiven dopaminergen Fasern der operationsseitigen Corpora striata wies bei Tieren, die einer Plazeboläsion mit NaCl unterzogen worden waren, keine signifikanten Veränderungen im Vergleich zur Dichte der nicht operierten Kontrollseite auf (Gruppe P – P: $96,7\% \pm 3,3\%$, Gruppe P – N: $101,2\% \pm 2,2\%$). Tiere der Gruppe 6 – P zeigten einen Verlust der Dichte auf $48,0\% \pm 4,7\%$ der Kontrollseite innerhalb dieser Gruppe. Eine sechs Stunden postoperativ begonnene Neuregulin1- β 1 Behandlung führte zu einem geringeren Faserverlust (Gruppe 6 – N: $75,2\% \pm 5,6\%$). In der Gruppe 6 – vN zeigte sich kein Benefit durch die Neuregulin1- β 1 Behandlung ($45,5 \pm 4,8$). Abbildung 12 zeigt die repräsentativen TH-immunreaktiven Bilder und Abbildung 13 zeigt die graphische Auswertung.

	Striatale Faserdichte (% der Kontrollseite)	Standardfehler
Gruppe P - P	96,7	3,3
Gruppe P - N	101,2	2,2
Gruppe 6 - P	48,0	4,7
Gruppe 6 - N	75,2	5,6
Gruppe 6 - vN	45,5	4,8

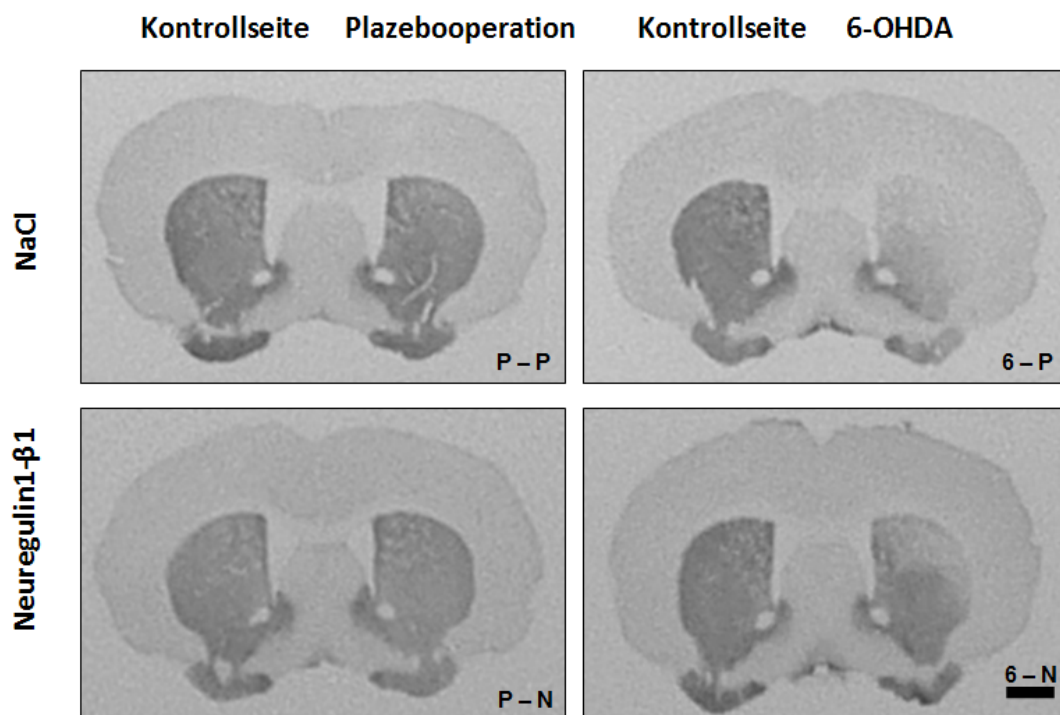


Abbildung 12) Jeweils ein repräsentativer Schnitt durch das Corpus striatum der Gruppen P – P, 6 – P, P – N, 6 – N. Der densitometrisch quantifizierte Effekt der Neuregulin1-β1 Behandlung der Gruppe 6 – N auf die striatale TH-Immunreaktivität ist bereits in der Übersichtsaufnahme zu erkennen. In der Gruppe 6 – vN ergab sich gegenüber der Gruppe 6 – P keine visuell feststellbare Differenz. Zur besseren Übersichtlichkeit wurde auf die Darstellung eines Schnittes aus der Gruppe 6 – vN verzichtet. Der Balken entspricht 2 mm.

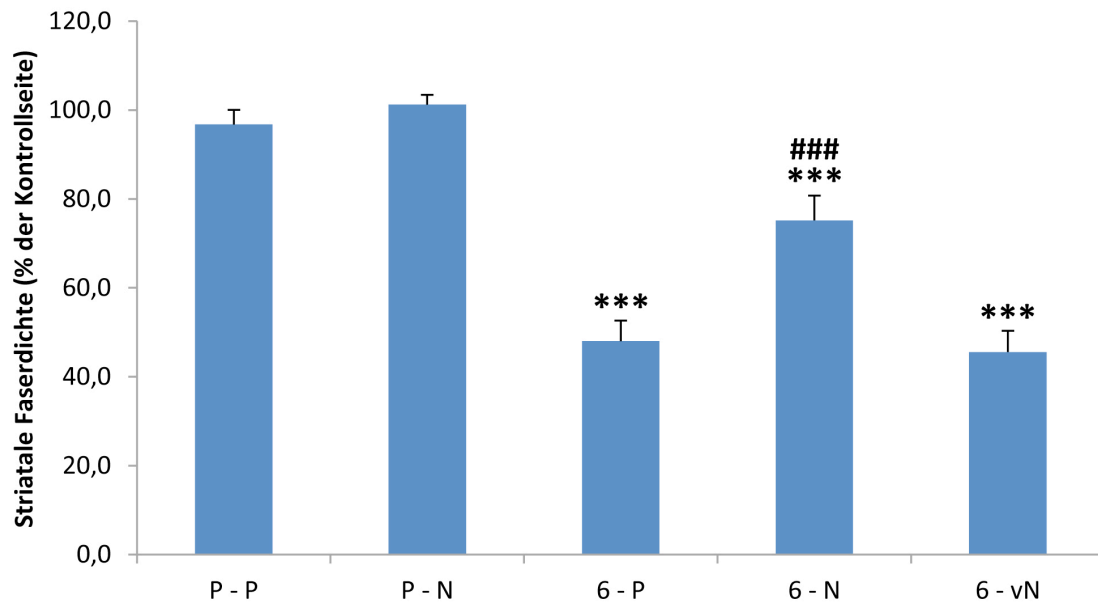


Abbildung 13) *** = $p < 0,001$ gegenüber P – P; ### = $p < 0,001$ gegenüber 6 – P

III. 3. Neuregulin1- β 1 schützt vor 6-OHDA-induziertem nigralen Zelluntergang

Bei der Auszählung der Neurone des Pars compacta der Substantia nigra in den TH-gefärbten Schnitten ergaben sich für die NaCl-injizierten Kontrolltiere der Gruppe P – P Zellzahlen von $4686,0 \pm 51,1$ auf der linken und $4576,0 \pm 66,3$ auf der rechten Hirnhälfte. Der mittlere Zellgehalt der rechten Seite (Operationsseite) entspricht somit $97,7\% \pm 1,4\%$ des Zellgehalts der nicht-operierten linken Seite des jeweiligen Versuchstiers. Tiere der Gruppe P – N zeigten eine erhöhte Zellzahl von $5468,3 \pm 53,7$ auf der linken Seite. Rechtsseitig ergaben sich $5405,0 \pm 78,3$ entsprechend einem Zellgehalt von $98,9\% \pm 1,3\%$ (Zellgehalt weiterhin bezogen auf die kontralaterale Seite des jeweiligen Versuchstiers). Eine 6-OHDA-Injektion führte in der Gruppe 6 – P zu einer reduzierten Zellzahl auf der Operationsseite von $1614,0 \pm 94,9$, entsprechend einem Zellgehalt von $35,3\% \pm 2,3$. Die Zellzahl der nicht-operierten Seite betrug $4586,0 \pm 53,2$. Im Vergleich zur Gruppe P – P zeigte sich der rechtsseitige Zellgehalt signifikant ($p < 0,001$) reduziert. Die linksseitigen Zellzahlen der Gruppen P – P und 6 – P entsprechen einander weitgehend. Eine intraperitoneale Neuregulin-Behandlung

fürte in der Gruppe 6 – N zu einem Ergebnis von $5364,0 \pm 83,6$ auf der nicht-operierten Seite (links) und im Vergleich zur intraperitoneal Plazebo-behandelten Gruppe (6 – P) zu einem geringeren Zellverlust und einer Zellzahl von $3284,0 \pm 162,8$ (rechts). Dies entspricht im Vergleich zur Gruppe 6 – P einem signifikant ($p < 0,001$) erhöhten rechtsseitigen Zellgehalt von $61,3\% \pm 3,0\%$. Dieser Effekt zeigte sich auch in der Gruppe 6 – vN. Dort ergaben die Zählungen Werte von $5218,2 \pm 256,4$ (links) und $3143,6 \pm 361,0$ (rechts), hier im Vergleich zur Gruppe 6 – P ebenfalls einem signifikant ($p < 0,001$) erhöhten rechtsseitigen Zellgehalt von $59,6\% \pm 6,0\%$ entsprechend.

Abbildung 14 zeigt die repräsentativen TH-immungefärbten Bilder und Abbildung 15 die graphische Auswertung.

	TH-pos. Neurone der Substantia nigra (% der Kontrollseite)	Standardfehler
Gruppe P - P	97,7	1,4
Gruppe P - N	98,9	1,3
Gruppe 6 - P	35,3	2,3
Gruppe 6 - N	61,3	3,0
Gruppe 6 - vN	59,6	6,0

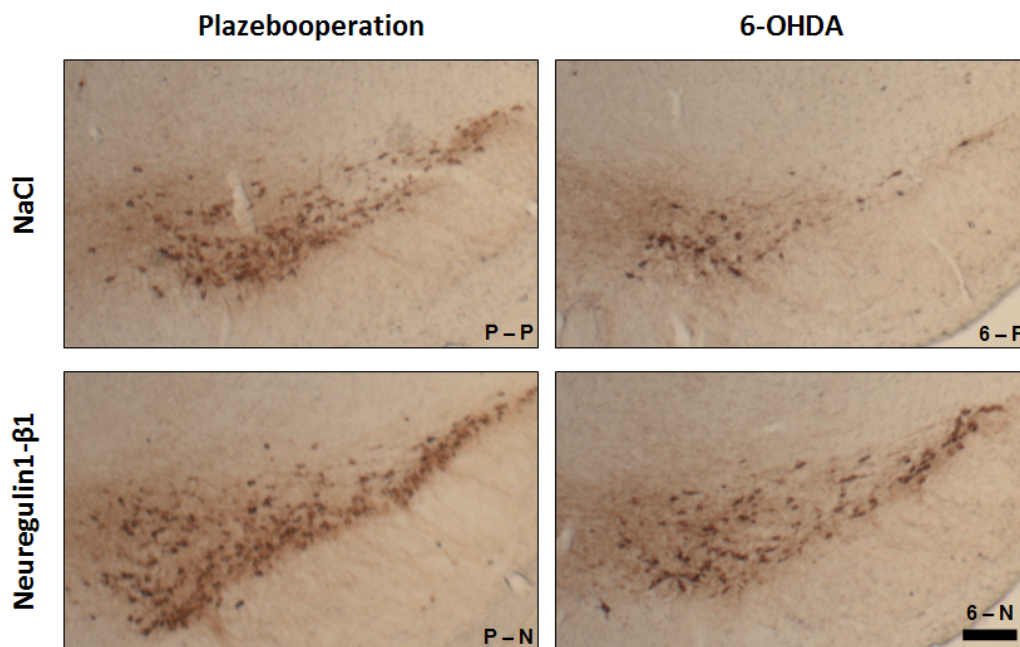


Abbildung 14) Jeweils ein repräsentativer Schnitt durch die Substantia nigra der Gruppen P – P, 6 – P, P – N, 6 – N. Der stereologisch quantifizierte Effekt der Neuregulin1-β1-Behandlung der Gruppe 6 – N ist bereits in der Übersichtsaufnahme zu erkennen. In der Gruppe 6 – vN ergab sich gegenüber der Gruppe 6 – N keine visuell feststellbare Differenz. Zur besseren Übersichtlichkeit wurde auf die Darstellung eines Schnittes aus der Gruppe 6 – vN verzichtet. Der Balken entspricht 200 µm.

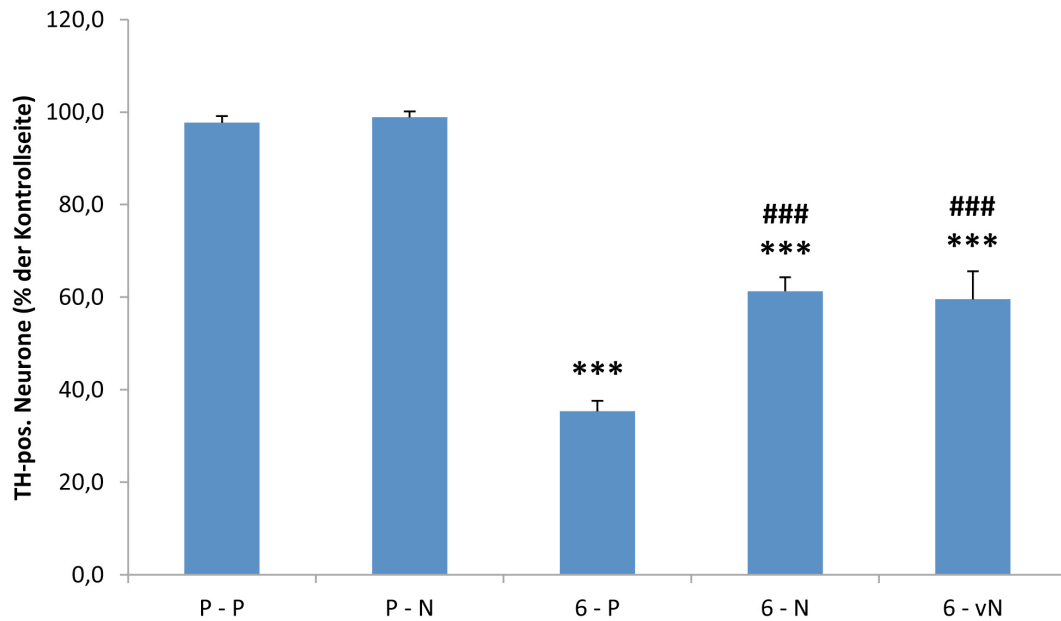


Abbildung 15) *** = $p < 0,001$ gegenüber P – P; ### = $p < 0,001$ gegenüber 6 – P

Die Zellzählungen in den Schnitten der Kresylviolett-Färbung (KV; Abbildung 16) bestätigten die Ergebnisse der Zählungen in den TH-gefärbten Schnitten. In der Gruppe P – P wurden linksseitig $4580,0 \pm 64,8$ und rechtsseitig $4464,0 \pm 78,4$ Zellen gezählt. Der rechtsseitige Zellgehalt entspricht somit $97,5\% \pm 1,2\%$ des linksseitigen Zellgehalts. $5566,7 \pm 75,3$ (links) und $5341,7 \pm 58,5$ (rechts) waren die Zellzahlen der Gruppe P – N, entsprechend einem $96,1\%igen \pm 1,1\%$ rechtsseitigem Zellgehalt. Innerhalb der Gruppe 6 – P sahen wir Zellzahlen von links $4634,0 \pm 78,5$ und rechts $1642,0 \pm 80,1$. Der rechtsseitige Zellgehalt entspricht somit $35,4\% \pm 1,4\%$ und ist auch in dieser Färbung im Vergleich zur Gruppe P – P signifikant ($p < 0,001$) reduziert. In der Gruppe 6 – N ergaben sich auf der linken Seite $5412,0 \pm 69,6$ Zellen, auf der rechten $3676,0 \pm 112,7$ Zellen. Auch in dieser Färbung ist der rechtsseitige Zellgehalt in der Gruppe 6 – N mit $67,9\% \pm 1,8\%$ signifikant ($p < 0,001$) im Vergleich zur Gruppe 6 – P erhöht. In der Gruppe 6 – vN lauten die Zellzahlen links $5556,4 \pm 122,0$ und rechts $3472,7 \pm 217,8$, auch hier entsprechend einem im Vergleich zur Gruppe 6 – P signifikant ($p < 0,001$) erhöhten rechtsseitigen Zellgehalt von $62,9\% \pm 4,1\%$.

	KV-pos. Neurone der Substantia nigra (% der Kontrollseite)	Standardfehler
Gruppe P - P	97,5	1,2
Gruppe P - N	96,1	1,1
Gruppe 6 - P	35,4	1,4
Gruppe 6 - N	67,9	1,8
Gruppe 6 - vN	62,9	4,1

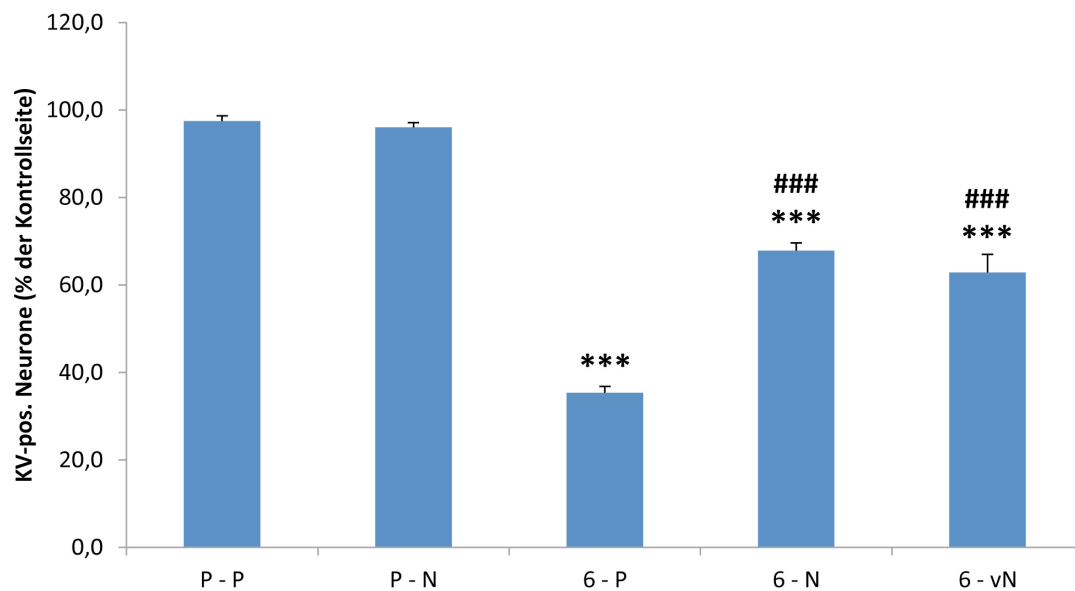


Abbildung 16) *** = $p < 0,001$ gegenüber P – P; ### = $p < 0,001$ gegenüber 6 – P

IV. Diskussion

In der vorliegenden Arbeit wurde zum ersten Mal gezeigt, dass peripher verabreichtes Neuregulin1- β 1 *in vivo* mesencephale dopaminerge Neurone der Maus vor 6-OHDA-induziertem Zelltod schützt. Hierdurch wurde ein wissenschaftlicher Beitrag zur Etablierung weiterer Therapieoptionen beim IPS geleistet. Um die Notwendigkeit dieses wissenschaftlichen Interesses zu begründen, wird im folgenden Kapitel zunächst ein Überblick über die bisherigen Therapieoptionen und deren Limitationen geboten. Im zweiten Teil wird die Wahl des verwendeten Tiermodells behandelt. Anschließend werden die Effekte von Neuregulin1- β 1 zunächst im gesunden Kontrolltier und daraufhin im Versuchstier diskutiert. Die folgenden Abschnitte befassen sich mit der Bluthirnschrankgängigkeit von Neuregulin1- β 1 und einem Vergleich von Neuregulin1- β 1 zu anderen Neuroprotektiva. Zuletzt werden Limitationen und Perspektiven auf der Basis der im Rahmen der vorliegenden Arbeit gefundenen Ergebnisse unter Einbeziehung möglicher molekularer Wirkungsweisen aufgezeigt.

IV. 1. Limitationen der bisherigen Therapieoptionen

Die Therapie des IPS findet bis heute nur auf symptomatischer Ebene statt. Neben medikamentöser und operativer Behandlung kommen auch supportive Maßnahmen zum Einsatz.

Das Prinzip der Pharmakotherapie beruht darauf, die striatale Konzentration oder Wirkung von Dopamin zu erhöhen. Dies kann z.B. durch die Verabreichung von Dopaminagonisten, Catechol-O-Methyltransferase (COMT)-Inhibitoren, MAO-B-Inhibitoren oder indirekt mittels NMDA-Antagonisten erreicht werden. All diese Therapeutika besitzen jedoch ein deutliches Nebenwirkungsprofil, welches verschiedenste Organsysteme betreffen kann (Eggert et al., 2012).

Das *prodrug* L-Dopa stellt zum aktuellen Zeitpunkt das wirksamste Medikament dar, auch wenn es keine Verzögerung des Fortschreitens der Krankheit bewirken kann. Es wird in allen Krankheitsstadien eingesetzt und immer in Kombination mit einem

Dopadecarboxylaseinhibitor verabreicht, um Dopamin-induzierte Nebenwirkungen in der Peripherie zu reduzieren und die Bioverfügbarkeit am Wirkort zu steigern (Carlsson, 2002; Oertel et al., 2011; Eggert et al., 2012). Mit zunehmender Therapiedauer kommt es allerdings im Verlauf bei einer Vielzahl der Patienten zu motorischen Komplikationen durch Wirkungseinschränkungen, Wirkungsfluktuationen sowie Dyskinesien (Reichmann, 2008; Schapira et al., 2009). Motorische Komplikationen werden nach sechsjähriger Therapie bei 70% der IPS-Patienten beobachtet (Schapira et al., 2009). Vor allem jüngere Patienten haben ein höheres Risiko als ältere Patienten, insbesondere Dyskinesien zu entwickeln (Eggert et al., 2012). Zu den Nebenwirkungen von L-Dopa zählen auch gastrointestinale Symptome wie Übelkeit und Brechreiz oder orthostatische Regulationsstörungen (Eggert et al., 2012).

Aufgrund dieser Nebenwirkungen und Wirkungslimitationen sowie vor dem Hintergrund des Unvermögens, den Krankheitsfortschritt zu verzögern, kann auch L-Dopa im Zusammenhang mit der Therapie des IPS nicht als ideale und dauerhaft zufriedenstellende Therapiemaßnahme angesehen werden.

Aufgrund der Unzufriedenheit mit den bislang zur Verfügung stehenden Therapieoptionen wächst in letzter Zeit zunehmend das Bemühen, eine Behandlungsmöglichkeit zu entwickeln, die im Sinne einer neuroprotektiven Therapie den Degenerationsprozess entweder maßgeblich verzögern oder sogar aufhalten kann.

Die vorliegende Arbeit ist Bestandteil dieser wissenschaftlichen Bemühungen.

IV. 2. Diskussion der gewählten Methoden

Zur Diskussion der Ergebnisse einer wissenschaftlichen Arbeit ist zunächst die kritische Betrachtung der verwendeten Methoden notwendig, um die Validität der Ergebnisse einschätzen zu können.

Die Ziele bei der Wahl der Methoden der vorliegenden Arbeit waren methodische Unsicherheiten auszuschließen, die Pathogenese des IPS zu reproduzieren und eine Überprüfbarkeit der Ergebnisse auf struktureller und funktioneller Ebene auf

diesbezügliche Übereinstimmung zu erreichen. Die Diskussion der gewählten Methoden ist Bestandteil dieses Kapitels.

Es gibt verschiedene Möglichkeiten, die bei dem IPS vorhandene nigrostriatale dopaminerge Transmissionsstörung in Tiermodellen hervorzurufen. *In vivo* befindet sich die Erforschung der Effekte von peripher verabreichtem Neuregulin auf das nigrostriatale System noch in einem Anfangsstadium. Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde ein etabliertes toxininduziertes Tiermodell mit Mäusen benutzt. Die Wirkungsweise des Neurotoxins 6-OHDA ist ausführlich in Kapitel I. 1. 8. beschrieben. Eine Alternative zu toxinbasierten Tiermodellen stellen beispielsweise die sogenannten transienten pharmakologischen Modelle dar. Hierbei wird beispielsweise Reserpin verwendet, um die Speicherfähigkeit für Katecholamine, insbesondere für Dopamin zu verringern (Carlsson et al., 1957). Dies führt jedoch lediglich zu reversiblen Veränderungen ohne neurodegenerative Prozesse. Da die vorliegende Arbeit eine Intervention in die Neurodegeneration untersucht, liegt es auf der Hand, dass ein transientes pharmakologisches Modell ungeeignet gewesen wäre.

Eine zunehmend wichtige Rolle spielen weiterhin genetische Parkinson-Modelle, die im Zusammenhang mit der Erforschung hereditärer Parkinson-Syndrome aufkamen. In jüngster Zeit scheint es einigen wenigen Autoren gelungen zu sein, den Untergang der dopaminergen Neurone im Rahmen solcher genetischer Modelle zu induzieren (Lundblad et al., 2012). Bewusst wurde jedoch ein bewährtes Modell gewählt, um bei etwaigen Interpretationsschwierigkeiten keine Zuordnungsprobleme zwischen modellbasierten Fehlern und etwaiger Unwirksamkeit des untersuchten Wachstumsfaktors zu haben.

Das verwendete 6-OHDA Mausmodell besitzt je nach Fragestellung verschiedene Möglichkeiten der Modifikation. So ist, wie in Kapitel I. 1. 8. erläutert, sowohl eine unilaterale als auch eine bilaterale cerebrale Injektion möglich. Desweiteren bieten sich verschiedene anatomische Strukturen für die Injektion an. Wir verwendeten die unilaterale Injektion, um das Rotationsverhalten derart behandelter Tiere als funktionellen Ausdruck der Schwere der nigrostriatalen Degeneration analysieren zu können.

Als Injektionsort wählten wir das Corpus striatum, um einen möglichst langsamen nigralen Zelluntergang zu induzieren und somit eine möglichst wirklichkeitsgetreue Imitation der ätiopathogenetischen Prozesse des IPS zu erreichen. Für die Degeneration scheinen in diesem Fall auch Apoptose-ähnliche Vorgänge verantwortlich zu sein (Bové et al., 2005). Daher ist bei intrastriärer Injektion ein weiteres wichtiges Charakteristikum des degenerativen Prozesses des IPS repräsentiert (Marti et al., 1997; Vila und Przedborski, 2003).

IV. 3. Der Effekt von Neuregulin1- β 1 auf das dopaminerge nigrostriatale System im gesunden Kontrolltier

Im gesunden Kontrolltier beobachteten wir eine Zunahme der Zellzahl dopaminerger Neurone der Pars compacta der Substantia nigra. Dies ist am ehesten die Folge einer Induktion eines dopaminergen Phänotyps in präexistenten nigralen Zellen und nicht durch Neurogenese erklärbar. Zu diesem Schluss gelangt man durch die Berücksichtigung von Ergebnissen, die durch ergänzende Untersuchungen innerhalb der Arbeitsgruppe gewonnen wurden. Nach Injektion des mitotische Zellen markierenden Thymidinanalogons *5-bromo-2'-deoxyuridine* (BrdU) konnten keine Neurone gefunden werden, die sowohl eine TH-Immunreaktivität als auch eine nukleäre Markierung durch BrdU aufwiesen (Carlsson et al., 2011).

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde ein vermehrter nigraler Zellgehalt nach Behandlung mit Neuregulin1- β 1 (im Vergleich zur NaCl-Behandlung) gefunden. Dies kann natürlich nicht ohne weiteres Rückschlüsse auf eine Verbesserung auf funktioneller Ebene zulassen. Die Ergebnisse der im Rahmen der vorliegenden Arbeit durchgeführten Rotationsverhaltenstests sind für sich allein genommen bereits jedoch ein starker Anhaltspunkt dafür.

Weiterhin wurde durch andere Untersuchungen der Arbeitsgruppe evaluiert, ob eine Neuregulin1- β 1 Behandlung, welche in analoger Weise zur vorliegenden Arbeit durchgeführt wurde, bei gesunden Kontrolltieren die striatale Dopaminkonzentration steigert (Carlsson et al., 2011). Dies konnte gezeigt werden und ist ein von den Versuchen der vorliegenden Arbeit unabhängiger Indikator dafür, dass eine

Neuregulin1- β 1 Behandlung pro-dopaminerge Effekte besitzt. Diese funktionellen Effekte im Sinne einer Verbesserung der striatalen Dopaminverfügbarkeit und schlussendlich der motorischen Situation sind das Ziel der Therapie beim IPS, sodass die Bedeutung der Ergebnisse im Rahmen der hier durchgeführten Rotationsverhaltenstests von großem Wert sind.

IV. 4. Neuregulin1- β 1 vermittelte Neuroprotektion

Der neuroprotektive Effekt auf die striatalen dopaminergen Projektionen durch Neuregulin1- β 1 Behandlung wurde mittels einer optischen Dichtemessung der TH-gefärbten striatalen Schnitte gezeigt. Da wir nicht voraussetzen konnten, dass der striatale Fasergehalt und die dopaminerge Zellzahl in der Pars compacta der Substantia nigra miteinander korrelieren, wurden weiterhin stereologische Zellzählungen der nigralen dopaminergen Neurone in TH-gefärbten und in Kresylviolett-gefärbten Schnitten vorgenommen.

Die TH-Immunfärbung führte innerhalb des Mittelhirns zu einer spezifischen Anfärbung der dopaminergen Zellen und stellte eine sichere Möglichkeit zur Abgrenzung gegenüber anderen Nerven- und Gliazellen dar.

Die zusätzliche Kresylviolettfärbung und Auszählung dieser Schnitte stellte sicher, dass die in der TH-Färbung erhobenen nigralen Zellzahlen der 6-OHDA-behandelten Tiere nicht durch eine herabgesetzte zelluläre Expression von TH mit einer falsch-niedrigen Zellzahl in der Auszählung der TH-gefärbten Schnitte verbunden war.

Da die Zellzahlen der beiden Färbungen einander weitgehend entsprachen, liegt es nahe, dass es sich um einen tatsächlichen 6-OHDA-induzierten Zellverlust handelte und nicht lediglich um einen Verlust des dopaminergen Phänotyps.

Der beobachtete Zellschutz der dopaminergen Neurone auf der lädierten Seite der Neuregulin1- β 1-behandelten Tiere kann nicht durch den generell vermehrten Zellgehalt in den Substantiae nigrae der Neuregulin1- β 1 behandelten Tiere begründet werden, da der Zellgehalt als Prozentzahl der kontralateralen, unlädierten Seite ausgedrückt wurde.

Diese beiden Tatsachen legen nahe, dass es sich um einen echten neuroprotektiven Effekt handelt.

Wie in Kapitel I. 1. 6. geschildert, treten motorische Symptome bei einem Zelluntergang von 40 bis 50% der dopaminergen Perikarya in der Substantia nigra auf (Lang und Obeso, 2004). Zum Todeszeitpunkt leicht betroffener Erkrankter zeigt sich mitunter sogar ein 60%iger Verlust der dopaminergen Neurone (Zigmond und Burke, 2002). In der vorliegenden Arbeit konnte durch die intraperitoneale Neuregulin-Behandlung der 6-OHDA-induzierten Zellverlust in einem Ausmaß verhindert werden, dass der nigrale, operationsseitige Zellgehalt $61,3\% \pm 3,0\%$ (Gruppe 6 – N) bzw. $59,6\% \pm 6,0\%$ (Gruppe 6 – vN) betrug. Dies ist ein weiterer Anhalt dafür, dass der gefundene Effekt von klinischer Relevanz ist, da sich der Zellgehalt nach Neuregulin-Therapie (Gruppe 6 – N und Gruppe 6 – vN) in einer Dimension bewegt, bei der beim Menschen keine oder nur milde Symptome zu erwarten gewesen wären.

Der volle neuroprotektive Effekt auf das gesamte nigrostriatale System wurde nur beobachtet, wenn die Neuregulin1- β 1-Behandlung sechs Stunden postoperativ begonnen wurde. Erfolgte die erste Verabreichung 48 Stunden postoperativ, so wurde zwar ein signifikanter Schutz der Zellen in der Pars compacta der Substantia nigra beobachtet, nicht aber ein Schutz der dopaminergen Fasern im Corpus striatum und auch keine positive Beeinflussung des Amphetamin-induzierten Rotationsverhaltens. Vermutlich lässt sich Letzteres dadurch begründen, dass zu dem Zeitpunkt der Verabreichung die Degeneration der Fasern im Corpus striatum, nicht aber der Zellkörper in der Substantia nigra, bereits abgelaufen war, da im intrastriatalen 6-OHDA-Modell die Degeneration der Fasern dem Absterben der Zellen zeitlich deutlich vorausgeht (Alvarez-Fischer et al., 2008). Ob dies möglicherweise durch eine zu kurzfristige Neuregulin-Therapie begründet werden kann, wird im letzten Abschnitt dieses Kapitels diskutiert.

IV. 5. Bluthirnschrankengängigkeit von Neuregulin1-β1

Die Bluthirnschranke kann nicht von allen Molekülen überwunden werden. Eine Möglichkeit stellt die freie Permeabilität dar. Die Fähigkeit zur Überwindung der Bluthirnschranke auf diese Weise hängt dabei nicht allein von der Größe, sondern auch von der Lipophilie eines Moleküls ab (Oldendorf, 1974). Weitere Möglichkeiten stellen beispielsweise Transportprozesse, Endozytose und extrazelluläre Pfade dar (Banks, 2009). Die Tatsache, dass Neuregulin1-β1 in der vorliegenden Arbeit nach peripherer Administration neuroprotektive Effekte an den Neuronen der Substantia nigra gezeigt hat, kann als Hinweis für eine Bluthirnschrankengängigkeit des Neuregulin1-β1 angesehen werden. Für ein 8 kDa großes Fragment von Neuregulin1-β1 zeigten Kastin et al. (2004) einen rezeptorvermittelten aktiven Transportprozess über die Blut-Hirn-Schranke. Ergänzende Arbeiten aus unserer Arbeitsgruppe konnten weiterhin zeigen, dass tatsächlich auch radioaktiv markiertes Neuregulin1-β1 die Bluthirnschranke penetriert und seinen Rezeptor ErbB4 insbesondere im vorderen Mittelhirn phosphoryliert (Rösler et al., 2011).

Diese Fähigkeit des Neuregulin1-β1 ist im Zusammenhang mit der Entwicklung eines auf unkomplizierte Art zu verabreichenden neuroprotektiven Therapeutikums von hohem Wert. Seit einiger Zeit ist es ein oberstes Ziel im Rahmen der Erforschung neuer Therapieansätze für neurodegenerative Erkrankungen, bluthirnschrankengängige Medikamente zu entwickeln (Thoenen und Sendtner, 2002).

IV. 6. Stellenwert von Neuregulin im Vergleich zu anderen Neuroprotektiva

Das am besten studierte Molekül aus der Gruppe der neuroprotektiven Substanzen ist GDNF, welches in mehreren Maus- und nicht-humanen Primatenmodellen potente neurotrophe Eigenschaften zeigte (Gill et al., 2003).

2006 konnten Lang et al. in einer Studie mit 34 IPS-Patienten für eine sechsmonatige intraputamenale Infusionstherapie von GDNF zeigen, dass diese zu einer Verbesserung der motorischen IPS-Symptome führte, die allerdings nicht signifikant war. Für GDNF

konnte bislang allerdings kein Transport über die Bluthirnschranke nachgewiesen werden. Dies bedeutet, dass die Verabreichung von GDNF intracerebral erfolgen muss und für den Patienten Schwierigkeiten mit sich bringen kann. So zeigten sich auch innerhalb dieser Studie bei einem Teil der Patienten Probleme bei der Positionierung des Katheters, über den die Verabreichung erfolgte.

2007 verglichen Lindholm et al. im 6-OHDA-Modell der Ratte die neurotrophen Eigenschaften von GDNF und einer von den Autoren neu entdeckten Substanz namens *conserved dopamine neurotrophic factor* (CDNF). CDNF zeigte gegenüber GDNF zumindest vergleichbare neuroprotektive Effekte sowohl im Rotationsverhaltenstest als auch bei der Densitometrie des Striatums und der stereologischen Auszählung der Neurone der Pars compacta der Substantia nigra (Lindholm et al., 2007). Allerdings muss auch CDNF wegen fehlender Bluthirnschrankengängigkeit intrastriatal appliziert werden, womit auch für diese Substanz eine vergleichsweise therapeutisch sicherere und komfortablere periphere Verabreichung nicht möglich ist.

Um das Problem einer dauerhaften intrastriatalen Infusionstherapie der nicht-bluthirnschrankengängigen Neuroprotektiva zu umgehen, ertestet man in letzter Zeit zunehmend die Möglichkeiten des Gentransfers. So zeigte eine Adenovirus-assoziierte Vektorform des Neurotrophins Neurturin (Cere-120) bereits bei MPTP-behandelten Affen sowie im 6-OHDA-Modell der Ratte schützende Effekte (Kordower et al., 2006; Gasmi et al., 2007; Yacoubian und Standaert, 2009). Bei dieser Therapiemöglichkeit wird das Virus-assoziierte Neurturin in das Hirngewebe gespritzt und dort die Neurturin-Expression in den körpereigenen Zellen eingeleitet.

Eine klinische *open-label* Studie, an welcher zwölf IPS-Patienten teilnahmen, lieferte Ergebnisse, die für einen klinischen Benefit und gute Verträglichkeit einer Adenovirus-assoziierten Neurturin-Behandlung sprechen (Marks et al., 2008). Es sollten jedoch erst die Ergebnisse größer angelegter Studien abgewartet werden, bevor eine eindeutige Beurteilung dieser Behandlungsoption erfolgen kann.

Im Allgemeinen sind gentransfektorische Behandlungen allerdings mit gewissen Risiken verbunden. Zunächst bergen die Operation, bei der die Vektoren in das Hirngewebe des Patienten gespritzt werden, Infektions- und Blutungsgefahren. Des

Weiteren genügt nicht eine einzelne Injektion, sondern es müssen, um ein genügend großes Areal des Corpus striatum zu treffen, mehrere Injektionen nacheinander vorgenommen werden, und bei jeder einzelnen Injektion steigen die erwähnten Infektions- und Blutungsrisiken. Trotz der mehrmaligen Injektionen ist es weiterhin leider möglich, dass es nicht zu einem gleichmäßig verbesserten klinischen Bild des Patienten kommt, da einerseits das IPS den Bewegungsapparat nicht gleichmäßig betrifft und andererseits Verteilungsinhomogenitäten der verabreichten Substanz auch nach mehrmaligen Injektionen bestehen können. Weiterhin ergeben sich mögliche Probleme aus der Tatsache, dass eine einmalig durch Viren getriggerte Expression nicht mehr aufgehalten werden kann. Dies bedeutet, dass auch etwaige Nebenwirkungen nicht ohne Weiteres zu kontrollieren sind.

Somit wäre im Vergleich mit gentrasfektorischen und intracerebralen Therapiemaßnahmen ein möglicher Vorteil einer Behandlung mit peripher verabreichbarem Neuregulin1- β 1 die bessere Steuerbarkeit in Bezug auf Wirkungs- und Nebenwirkungsprofil. Depboylu et al. konnten im Jahr 2012 weiterhin zeigen, dass in den verbliebenen nigralen dopaminergen Neuronen von IPS-Patienten der prozentuale Anteil von Zellen, die den ErbB4-Rezeptor exprimieren, mit $94,9 \pm 2,5\%$ im Vergleich zu nigralen dopaminergen Neuronen gesunder Kontrollpersonen ($85,0 \pm 5,0\%$) gesteigert war (Depboylu et al., 2012). Dies spricht ebenfalls für eine gute Steuerbarkeit.

Unter den bis zum heutigen Tag zum Einsatz kommenden oral verabreichbaren Therapeutika wurden für Dopaminagonisten erste Hinweise gefunden, dass sie zu einer Verlangsamung des Krankheitsverlaufs, möglicherweise durch einen neuroprotektiven Effekt, führen könnten. Allerdings ist dies bislang nicht bewiesen (Eggert et al., 2012). Insgesamt muss der Nachweis der Bluthirnschrankengängigkeit von Neuregulin1- β 1 kombiniert mit den in der vorliegenden Arbeit gezeigten neuroprotektiven Eigenschaften dieses körpereigenen Wachstumsfaktors als bedeutender Entwicklungsschritt auf dem Weg zu einer klinisch relevanten neuroprotektiven Therapie des IPS angesehen werden.

IV. 7. Limitationen, Perspektiven und Ausblick

Die viel versprechenden Ergebnisse dieser Arbeit sollten als Anlass genommen werden, weitere Bemühungen in die Erforschung der Effekte von Neuregulin1- β 1 im Zusammenhang mit dem IPS zu investieren. Zunächst sollte die Wirkungsweise, vor allem der bisherig gefundenen Effekte, in ausreichendem Maße bekannt sein.

Yurek et al. zeigten schon im Jahre 2004 anhand eines Tiermodells mit Ratten, dass eine Injektion von Neuregulin1- β in die dorsale Nachbarschaft der Substantia nigra zu einer raschen Dopaminfreisetzung im Corpus striatum führt (Yurek et al., 2004). In einem Primärkulturmodell mit dopaminergen Neuronen aus dem Mittelhirn der Ratte führte eine Behandlung mit Neuregulin1 Typ II im Vergleich zu unbehandelten Kontrollzellen zu einer höheren Dopaminaufnahme in die Zellen, einem vermehrten Aussprossen von Neuriten und einer größeren Zahl von dopaminergen Zellen, was durch den immunhistochemischen Nachweis von TH gezeigt wurde (Zhang et al., 2004). Dieser Effekt kristallisierte sich auch in einem Vergleich von mit 6-OHDA-behandelten Zellen und unbehandelten Zellen heraus (Zhang et al., 2004).

Unter Berücksichtigung dieser Arbeiten lassen sich für die im Rahmen der vorliegenden Arbeit gefundenen Ergebnisse mehrere durch Neuregulin1- β 1-induzierte Wirkungsmechanismen diskutieren. Zunächst ist nach aktuellem Kenntnisstand der beteiligte Rezeptor an der nigralen dopaminergen Zelle der ErbB4-Rezeptor (siehe Kapitel I. 2. 9.) Die Aktivierung des ErbB4-Rezeptors führt hauptsächlich zu Signalweiterleitung über den Mitogen aktiviertes Protein (MAP)-Kinaseweg, der über *rat sarcoma* (Ras) vermittelt wird, oder den Phosphatidylinositol 3 (PI3)-Kinaseweg (Iwakura und Nawa, 2013). Xu et al. zeigten im Jahr 2012, wie Neuregulin1- β 1 Oligodendrozytenprogenitorzellen vor künstlich induzierter Apoptose schützt. Die Autoren konnten nachweisen, dass Neuregulin1- β 1 zu einer vermehrten Expression des ErbB4-Rezeptors, nicht jedoch des ErbB2-Rezeptors führte. Weiterhin konnten sie über Westernblotanalysen einen vermehrten Nachweis von phosphoryliertem Akt (p-Akt, auch phosphorylierte Proteinkinase B) nach Neuregulin1- β 1-Behandlung zeigen. P-Akt wird im Rahmen des PI3-Kinasewegs von Phosphatidylinositol-3,4,5-Trisphosphat aktiviert. Zur weiterführenden Untersuchung wurden die Zellen mit dem IP3-Kinaseinhibitor Wortmannin behandelt. Dies führte zu einer Unterdrückung des

durch Neuregulin1- β 1 beobachteten Effekts – der vermehrte Nachweis von p-Akt war nicht mehr gegeben. Der MAP-Kinase-Inhibitor UO126 zeigte in einem analog durchgeführten Versuch keine Auswirkungen, sodass keine Hinweise gefunden werden konnten, dass Neuregulin1- β 1 in diesem Zusammenhang eine Wirkung durch eine Signalweiterleitung über den MAP-Kinaseweg besitzt (Xu et al., 2012).

Darüber hinaus konnte durch den Vergleich zwischen der Behandlung mit dem ErbB2 Inhibitor AG879 und dem ErbB4 Inhibitor AG1478 Anhalt dafür gefunden werden, dass Neuregulin1- β 1 auch im Rahmen dieses Versuchs ErbB4 vermittelt wirkt, da AG1478 die Aktivität des IP3/Akt-Kinaseweges signifikant unterdrückte, wohingegen AG879 keine Auswirkungen zeigte. Insgesamt konnte im Rahmen der Arbeit von Xu et al. demonstriert werden, dass Neuregulin1- β 1 den intrazellulären IP3/Akt Kinaseweg über den ErbB4-Rezeptor in Gang setzt. Anhalt für eine ErbB2-vermittelte Wirkung oder für eine Weiterleitung über den MAP-Kinaseweg wurde nicht gefunden (Xu et al., 2012).

Übertragen auf die gefundenen Effekte im Rahmen der vorliegenden Arbeit ist ein ähnlicher Mechanismus über einen ErbB4-vermittelten IP3-Kinaseweg denkbar, da wie in Kapitel I. 2. 9. dargelegt, aus Vorarbeiten bekannt ist, dass mRNA von ErbB4 eine starke Colokalisation mit den dopaminergen Neuronen in der Pars compacta der Substantia nigra der Maus zeigt (Abe et al., 2009) und somit der erforderliche Rezeptor zur Verfügung steht.

Im Rahmen ergänzender Untersuchungen innerhalb der Arbeitsgruppe zeigte sich die Dopaminkonzentration des dorsalen Bereichs des Corpus striatum, welches vor allem Afferenzen aus der Pars compacta der Substantia nigra erhält, stärker gesteigert als im ventralen Corpus striatum, welches den Nucleus accumbens enthält und seine Afferenzen aus der ventralen tegmental Area (VTA) des Mittelhirns bezieht (Carlsson et al., 2011). Diese Ergebnisse stehen in guter Übereinstimmung mit vorherigen Berichten über eine stärkere Expression von ErbB4-Rezeptoren in der Pars compacta der Substantia nigra im Vergleich zur VTA (Thuret et al., 2004; Abe et al., 2009). Somit untermauert diese Beobachtung den postulierten Mechanismus, dass im Rahmen der vorliegenden Arbeit die Wirkungsweise von Neuregulin1- β 1 ErbB4-rezeptorvermittelt abgelaufen ist, da die Tiere, die im Rahmen der ergänzenden Untersuchungen außerhalb der hier vorliegenden Arbeit untersucht wurden, in analoger Weise zur hier

vorliegenden Arbeit mit Neuregulin1- β 1 behandelt worden waren. Weiterhin lässt sich aus der stärkeren Expression von ErbB4-Rezeptoren in der Pars compacta der Substantia nigra der Schluss ziehen, dass eine Neuregulin1- β 1 Therapie vornehmlich über das nigrostriatale System auf die motorischen Funktionen der Basalganglien wirken würde bei gleichzeitig geringer Assoziation zu Nebenwirkungen, die über das mesolimbische System (VTA, Nucleus accumbens) vermittelt werden, was beispielsweise bei Störungen wie Schizophrenie oder dopaminergen Psychosen gegeben ist.

Die Frage, ob eine therapeutische Wirksamkeit über einen ähnlichen Wirkmechanismus auch beim Menschen gegeben wäre, lässt sich natürlich nur spekulativ beantworten. Dafür spricht die Tatsache, dass sich auch in der Substantia nigra von Affen und Mensch eine sehr starke ErbB4-Expression zeigt - in der Pars compacta höher als in der benachbarten Pars reticularis (Zheng et al., 2009).

Über den bislang diskutierten Wirkmechanismus hinaus lässt sich anhand der bereits zitierten Arbeiten von Xu et al. ein additiver Mechanismus von Neuregulin1- β 1 für die vorliegende Arbeit postulieren. Da die Autoren zeigten, dass die Apoptose-fördernde Caspase-3 nach Neuregulin-Behandlung im Western Blot signifikant reduziert nachweisbar war, dieser Effekt jedoch durch Wortmannin-Behandlung ausgelöscht wurde, lässt dies den Schluss zu, dass Neuregulin1- β 1 über den IP3-Kinaseweg antiapoptotisch wirkt. Wie in Kapitel I. 1. 6. 1. erwähnt, spielen auch Apoptose-Prozesse eine Rolle bei der Ätiopathogenese des IPS (Vila und Przedborski, 2003). Da davon ausgegangen werden kann, dass für die in der vorliegenden Arbeit durch Injektion von 6-OHDA in das Corpus striatum induzierte retrograde Degeneration der dopaminergen Zellen in der Substantia nigra auch Apoptose-ähnliche Vorgänge verantwortlich sind (Bové et al., 2005), wäre somit ein weiteres wichtiges Charakteristikum des degenerativen Prozesses des IPS im Rahmen der vorliegenden Arbeit repräsentiert und ein postulierbarer Mechanismus des im Rahmen der vorliegenden Arbeit gefundenen neuroprotektiven Effektes die ErbB4-induzierte und IP3-vermittelte Suppression apoptotischer Mechanismen. Untermauert wird dieser postulierte antiapoptotische Wirkmechanismus durch eine Arbeit von Cui et al., in welcher demonstriert wurde, dass auch *in vivo* bei transgenen Mäusen Neuregulin1- β 1

nach peripherer Verabreichung über den den IP3-Kinaseweg antiapoptotisch wirkt (Cui et al., 2013).

Ausblickend wäre es einerseits sinnvoll, die von Xu et al. gefundenen Effekte von Neuregulin1- β 1 im Rahmen von Arbeiten an der nigralen dopaminergen Zelle zu reproduzieren, um zu zeigen, dass die hier postulierten Mechanismen tatsächlich der Neuregulin1- β 1-induzierten Wirkung entsprechen. Interessant wäre es auch, zu untersuchen, ob bei einer längerfristigen Neuregulin1- β 1-Behandlung mit zunehmender Therapiedauer die striatale Faserdichte zunimmt. Anhalt dafür lässt sich zum einen aus der oben zitierten Arbeit von Zhang et al. aus dem Jahr 2004 gewinnen, in der gezeigt werden konnte, dass in einem Primärkulturmodell mit dopaminergen Neuronen eine Behandlung mit Neuregulin1 Typ II unter anderem zu einem vermehrten Aussprossen von Neuriten und einer größeren Zahl von dopaminergen Zellen geführt hat. Zum anderen wurde im Rahmen der vorliegenden Arbeit gefunden, dass eine verzögerte Verabreichung von Neuregulin1- β 1 lediglich einen signifikanten Schutz der Zellkörper in der Pars compacta der Substantia nigra verursachte - dies jedoch sogar bei 48 Stunden postoperativ einsetzender Neuregulin1- β 1 Behandlung - während der striatale Fasergehalt und das Amphetamin-induzierte Rotationsverhalten nicht signifikant verbessert wurden. Somit wäre die Theorie zu überprüfen, ob auch *in vivo* ein vermehrtes oder erneutes Aussprossen von Neuriten durch Neuregulin-Behandlung induziert werden kann. Dies könnte beispielsweise anhand unterschiedlicher Behandlungsdauer im Rahmen eines Versuchs analog zur vorliegenden Arbeit verifiziert werden.

Weiterhin wäre es wichtig, das Experiment der vorliegenden Arbeit auf weitere IPS-Tiermodelle auszudehnen, die verstärkt andere ätiopathogenetische Aspekte des IPS widerspiegeln. Dazu zählen unter Anderem das MPTP-Modell, welches vor Allem mitochondriale Fehlfunktionen repräsentiert oder ein genetisches Modell, welches den Lewy-Körperchen ähnelnde alpha-Synuclein-haltige Proteinaggregate in der Substantia nigra hervorruft und einen dortigen dopaminergen Zelltod induziert (Lundblad et al., 2012). In der Tat zeigen noch nicht publizierte Ergebnisse der Arbeitsgruppe, dass Neuregulin1- β 1 nigrale dopaminerge Neurone der Mäuse gegen MPTP-Toxizität schützt. Nicht nur in Rahmen anderer Modelle, sondern auch bei weiteren Tierarten, beispielsweise bei Primaten, die dem Menschen näher verwandt sind als die hier eingesetzten Mäuse, sollte die Wirkung von Neuregulin1- β 1 getestet werden. Sollte sich

Neuregulin1- β 1 auch in diesen Modellen bewähren, gilt es verschiedene denkbare Limitationen dieses Wirkstoffs auszuschließen. Dies könnten z.B. neutralisierende Antikörper sein. Im Rahmen der von Lang et al. durchgeführten klinischen Studie zur Bewertung der neuroprotektiven Potenz des intrastriatal verabreichten GDNF traten diese gleich bei drei der 34 IPS-Patienten auf (Lang et al., 2006). Somit sollte man dieser denkbaren Limitation bei einer Neuregulin1- β 1-Behandlung beispielsweise im Rahmen von Versuchen an nicht-humanen Primaten oder bei Schweinen nachgehen, die dem Menschen in immunologischer Hinsicht ähnlicher sind als beispielsweise Kleintiere wie Mäuse oder Ratten. Anhalt dafür, dass mit der Bildung von neutralisierenden Antikörpern nicht unverweigerlich gerechnet werden muss, lässt sich durch die Tatsache gewinnen, dass dies bei den *Biologica* Insulin und Interferon bekanntermaßen nicht der Fall ist.

Darüber hinaus sind bereits klinische Studien, allerdings kardiologisch orientiert, mit Neuregulin1 initiiert worden. So läuft beispielsweise aktuell eine klinische Phase III Studie unter dem Titel „Clinical Trial to Evaluate the Efficacy and Safety of Recombinant Human Neuregulin-1 for Subcutaneous Administration in Patients With Chronic Systolic Heart Failure“ (<http://www.clinicaltrials.gov/show/NCT01214096>). Diese Evaluationen kardialer Effekte durch Neuregulin1 wurden vor dem Hintergrund begonnen, dass man bei Brustkrebspatienten die Entwicklung schwerer Herzinsuffizienzen als Nebenwirkung der Therapie mit Trastuzumab, einem monoklonalen Antikörper, der den ErbB2-Rezeptor blockiert, beobachtet hatte (Yan und Morgan, 2011). Daraus erwuchs zunächst der Umkehrschluss, eine Stimulation des ErbB2-Rezeptors könne eine verbessernde Wirkung auf die Herzfunktion besitzen, was sich bereits in Tiermodellen für Neuregulin1- β bestätigen lies (Sawyer und Caggiano, 2011). Im Hinblick auf den molekularen Wirkmechanismus an der Herzmuskelzelle ist bislang die Funktion, dass der ErbB2-Rezeptor als Korezeptor des ErbB4-Rezeptors fungiert, anerkannt (Citri und Yarden, 2006; Jabbour et al., 2011). Jüngst konnte im Rahmen einer klinischen Studie gezeigt werden, dass nach elftägiger intravenöser Verabreichung einer Neuregulin1- β -Isoform eine akute und anhaltende Verbesserung der Herzleistung erreicht werden konnte (Jabbour et al., 2011). Bei zwei der 16 Patienten traten Nebenwirkungen in Form von Übelkeit und abdominellen Krämpfen auf, wobei einer dieser Patienten darüber hinaus im Verlauf eine instabile Angina pectoris mit laborchemischem Korrelat, der Troponin I Erhöhung, erlitt. Bei einem

weiteren Patienten wurden während der Beobachtungszeit zwei Hautkanzerosen entdeckt. Obwohl angenommen wird, dass diese schon vor Beginn der Neuregulin-Therapie existierten, kann nicht ausgeschlossen werden, dass Neuregulin eine begünstigende Wirkung der Entwicklung oder Progression im Rahmen von Krebserkrankungen besitzt (Jabbour et al., 2011). Insgesamt kommen die Autoren jedoch zu dem Schluss, dass die systemische Neuregulin-Therapie weitgehend gefahrfrei anwendbar war und gut vertragen wurde (Jabbour et al., 2011).

Übertragen auf die Interessen bezüglich der Erforschung der Wirkungsweisen von Neuregulin beim IPS sind sicherlich ähnliche Nebenwirkungen denkbar, wie sie im Rahmen der kardiologischen Studien auftraten. Ausblickend ist sicherlich eine interdisziplinäre Zusammenarbeit und Interpretation von Ergebnissen angezeigt. Sollten sich beispielsweise im Rahmen der kardiologischen Untersuchungen Limitationen herauskristallisieren, die unabhängig von der Indikation auch bei Anwendung bei IPS-Patienten bestehen würden, sollte man aus ethischer Sicht auf Versuchsausweitungen auch in der Parkinson-Forschung verzichten. Andererseits können sicherlich auch aus positiven Nebeneffekten Rückschlüsse auf Anwendbarkeitserweiterungen gezogen werden. So könnten beispielsweise anhand der kardiologischen Studiendaten retrospektive Analysen bei Patienten, die als Begleiterkrankung ein IPS aufweisen, im Hinblick auf etwaige Verbesserung extrapyramidalmotorischer Funktionen durchgeführt werden.

In der Zusammenschau scheint Neuregulin als humaner Wachstumsfaktor ein hohes Potential an therapeutischem Nutzen für verschiedene Erkrankungen zu bieten, wobei zum jetzigen Zeitpunkt noch zu wenig über unerwünschte Nebenwirkungen bekannt ist. Gerade im Hinblick auf ein möglicherweise bestehendes onkogenes Potential des Wachstumsfaktors Neuregulin1- β 1 sollten erweiternde Arbeiten mit Versuchstieren diesbezüglich durchgeführt werden, zumal bei geplanter peripherer oder systemischer Administration verschiedenste Organsysteme betroffen sein könnten.

V. Zusammenfassung

In der vorliegenden Arbeit wurde gezeigt, dass die intraperitoneale Injektion von Neuregulin1- β 1 dopaminerge nigrale Neurone vor dem Zelluntergang schützt. Im Rahmen des 6-Hydroxydopamin (6-OHDA)-Modells, einem der wichtigsten Tiermodelle in der Erforschung des Idiopathischen Parkinsonsyndroms (IPS), wurde Mäusen einseitig intrastriatal 6-OHDA injiziert. Dies führte zu einer retrograden Degeneration der nigralen dopaminergen Zellen, sodass operationsseitig ein verringerter Zellgehalt von $35,3\% \pm 2,3\%$ bezogen auf die unlädierte, kontralaterale Seite zu verzeichnen war (Gruppe 6 – P). Tiere, bei denen die Neuregulin1- β 1-Behandlung sechs Stunden postoperativ (Gruppe 6 – N) begonnen worden war, wiesen einen rechtsseitigen Zellgehalt von $61,3\% \pm 3,0\%$ auf. Wurde Neuregulin1- β 1 erstmals nach 48 Stunden verabreicht (Gruppe 6 – vN), ergab sich ein Zellgehalt von $59,6\% \pm 6,0\%$. Somit war der Zellgehalt in beiden Gruppen signifikant erhöht (jeweils $p < 0,001$).

Die intraperitoneale Gabe von Neuregulin1- β 1 in Placebo-operierten Kontrolltieren führte zur Steigerung der Neuronenzahl auf $5468,3 \pm 53,7$ gegenüber der Kontrollgruppe ($4686,0 \pm 51,1$), erklärbar durch die Induktion eines dopaminergen Phänotyps in präexistente Zellen. Der Zellgehalt wurde als Prozentzahl der kontralateralen, unlädierten Seite ausgedrückt, um zu zeigen, dass der gefundene Effekt durch Neuregulin1- β 1 nicht auf diese Induktion zurückzuführen ist. In einer weiteren Färbung wurden die Zellzahlen bestätigt.

Weiterhin schützt Neuregulin1- β 1 signifikant ($p < 0,001$) vor striatalem dopaminergem Faserdichteverlust ($75,2\% \pm 5,6\%$ Fasergehalt der Gruppe 6 – N bei $48,0\% \pm 4,7\%$ der Gruppe 6 – P). Auf funktionaler Ebene zeigte die Neuregulin1- β 1-Behandlung eine Reduktion des durch 6-OHDA hervorgerufenen Rotationsverhaltens der Tiere ($2,4 \pm 0,6$ Umdrehungen pro Minute). In der Gruppe 6 – N ergab sich mit $1,1 \pm 0,6$ Umdrehungen pro Minute kein signifikanter Unterschied gegenüber der Kontrollgruppe mit $0,4 \pm 0,2$ Umdrehungen. Ein nicht-signifikanter Effekt zeigte sich auch, wenn Neuregulin1- β 1 erst nach 48 Stunden verabreicht worden war ($1,9 \pm 0,4$ Umdrehungen pro Minute).

Da eine symptomatische Therapie bislang die einzige Behandlungsoption des IPS darstellt, wächst in letzter Zeit zunehmend das Bemühen, eine den Degenerationsprozess verzögernde oder aufhaltende neuroprotektive Therapie zu entwickeln. Neuregulin1- β 1 ist fähig die Bluthirnschranke zu passieren. Für alle bisher untersuchten Neurotrophine mit neuroprotektiven Eigenschaften für die dopaminergen Nervenzellen der Substantia nigra konnte bislang keine Bluthirnschrankengängigkeit bei systemischer Gabe gezeigt werden.

Die Behandlung mit Neuregulin1- β 1 zeigte im Rahmen der vorliegenden Arbeit potente neuroprotektive Eigenschaften auf das nigrostriatale dopaminerge System.

V. 1. Summary

The present study shows that intraperitoneal injection of Neuregulin1- β 1 protects dopaminergic nigral neurons against cell death. This was shown in the 6-hydroxydopamine (6-OHDA)-model, one of the most important animal-models of idiopathic Parkinson's disease (IPS). 6-OHDA was unilaterally injected into the striatum in mice, which induced a retrograde degeneration of nigral dopaminergic cells, so on injection-side a reduced number of cells (expressed in percentage of the contralateral intact side) of $35.3\% \pm 2.3\%$ was observed (group 6 – P). Animals, which received Neuregulin1- β 1 injection immediately (starting 6 hours post operation = group 6 – N), showed a cell number on the lesioned side of $61.3\% \pm 3.0\%$ and animals, which received Neuregulin1- β 1 treatment delayed (starting 48 hours post operation = group 6 – vN), showed $59.6\% \pm 6.0\%$. These results were statistically relevant in both Neuregulin1- β 1 treated groups ($p < 0.001$).

In sham-operated animals a higher cell number (5468.3 ± 53.7) was observed after intraperitoneal injection of Neuregulin1- β 1 in comparison to not Neuregulin1- β 1 treated sham-operated animals (4686.0 ± 51.1 ; control group). This effect could be explained by induction of a dopaminergic phenotype in preexisting cells. In order to exclude, that the Neuregulin1- β 1 effect is a mere consequence of this induction, we expressed the cell numbers as percentage of the contralateral intact side. All shown results were confirmed in another staining.

Additional results demonstrate Neuregulin1- β 1 protected significantly ($p < 0.001$) against loss of striatal dopaminergic fibers ($75.2\% \pm 5.6\%$ striatal density in group 6 – N; $48.0\% \pm 4.7\%$ in group 6 – P). Consistent with the histological findings Neuregulin1- β 1 treatment reduced 6-OHDA-associated rotational behaviour. Neuregulin1- β 1 untreated animals showed 2.4 ± 0.6 rotations per minute. In group 6 – N 1.1 ± 0.6 rotations per minute were observed, which was not significantly different to 0.4 ± 0.2 rotations in controls. Delayed Neuregulin1- β 1 treatment features no statistically relevant effect (1.9 ± 0.4 rotations per minute).

Current therapy of IPS is based on symptomatic improvement, and neuroprotective therapy is not available. Due to this circumstance it is important to develop

neuroprotective therapy strategies. Neuregulin1- β 1 is the only known neuroprotective neurotrophine that passes the blood brain barrier upon systemic application.

In this study potent neuroprotective effects of Neuregulin1- β 1 treatment on the nigrostriatal dopaminergic system were demonstrated.

VI. Abkürzungen

Abkürzung	Entsprechung
ABC-Kit	Avidin-Biotin-Complex-Kit
ADAM	<i>a disintegrin and metalloproteinase</i>
AG879	ErbB2 Inhibitor
AG1478	ErbB4 Inhibitor
ANOVA-Test	<i>analysis of variance</i> - Test
AP	anteroposterior
ARIA	<i>achetylcholine receptor-inducing activity</i>
ATP	Adenosin-tri-phosphat
Aqua dest.	Aqua destillatum / destilliertes Wasser
BACE	<i>β-site of amyloid precursor proteine cleaving enzyme</i> / Memapsin 2
BrdU	<i>5-bromo-2'-deoxyuridine</i>
CDNF	<i>conserved dopamine neurotrophic factor</i>
CE	<i>coefficient of error</i> , dt. Fehlerquotient
CEP-1347	<i>mixed lineage kinase inhibitor</i> / KT7515
cm	Zentimeter
COMT	Catechol-O-Methyltransferase
DAB	3,3'-Diaminobenzidin
DAT	Dopamin-Transporter
DATATOP-Studie	<i>Deprenyl and Tocopherol Antioxidative Therapie of Parkinsonism Study</i>
DJ-1 / PARK 7	<i>parkinson protein 7</i>
DNA	<i>deoxyribonucleic acid</i>
DV	dorsoventral
EGF	<i>epidermal growth factor</i>
ErbB	<i>erythroblastic leukemia viral oncogene homolog</i> / Her
et al.	et alii
GABA	<i>gamma-aminobutyric acid</i>
GDNF	<i>glial cell line-derived neurotrophic factor</i>
GGF	<i>glial growth factor</i>

GPI-1485	neuroimmunophiler Ligand
HB-EGF	<i>heparin-binding EGF-like growth factor</i>
HER	<i>heregulin</i>
Her	humaner EGF-Rezeptor
Ig	Immunglobulin
i.p.	intraperitoneal
IPS	idiopathisches Parkinson-Syndrom
kDa	Kilodalton
KG	Körpergewicht
kg	Kilogramm
L-Dopa	L-3,4-Dihydroxyphenylalanin
LRRK2	<i>leucine-rich repeat kinase 2</i>
LSD	<i>least significant difference</i>
MAO	Monoaminoxidase
MAP	Mitogen aktiviertes Protein
mg	Milligramm
min	Minute
ML	mediolateral
mm	Millimeter
MPTP	1-Methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridin
MSN	<i>medium spiny neuron</i>
mRNA	<i>messenger ribonucleic acid</i>
μL	Mikroliter
NaCl	Natriumchlorid
NDF	<i>neu differentiation factor</i>
NET	Norepinephrin-Transporter
ng	Nanogramm
NMDA-Antagonisten	N-Methyl-D-Aspartat-Antagonisten
NRG 1 - 4	Neuregulin-Gene 1 - 4
OD	optische Dichte
6-OHDA	6-Hydroxydopamin
p-Akt	phosphoryliertes Akt
Parkin	<i>parkinson protein 2</i>
PBS	<i>phosphate buffered saline</i> , dt. phosphatgepufferte Salzlösung

PB	<i>phosphate buffer</i> , dt. Phosphatpuffer
PFA	Paraformaldehyd
PINK1	<i>PTEN-induced putative kinase 1</i>
PTEN	<i>phosphatase and tensin homolog</i>
PI3	Phosphatidylinositol 3
prä-mRNA	<i>precursor messenger ribonucleic acid</i>
Ras	<i>rat sarcoma</i> (Proto-Onkogen)
RNS	<i>reactive nitrogen species</i>
ROADS-Studie	<i>RO 19-6327 Assessment and dose finding study</i>
ROI	<i>region of interest</i>
ROS	<i>reactive oxygen species</i>
SEM	<i>standard error of mean</i>
SINDEPAR-Studie	Sinemet-deprenyl-parlodel-Studie
SMDF	<i>sensory and motor neuron-derived factor</i>
SMO CE	Fehlerquotient nach Scheaffer
ssf	<i>section sampling fraction</i>
TACE	<i>tumour necrosis factor-α converting enzyme</i> / ADAM17
TCH346	Omigapil
TEMPO-Studie	<i>TVP-1012 in early monotherapy for PD outpatients study</i>
TGF α	<i>transforming growth factor alpha</i>
TH	Tyrosinhydroxylase
TVP-1012	Rasagilin
UO126	MAP-Kinase-Inhibitor
VTa	ventrale tegmentale Area

VII. Literaturverzeichnis

- Abe Y, Namba H, Zheng Y, Nawa H (2009) In situ hybridization reveals developmental regulation of ErbB1-4 mRNA expression in mouse midbrain: implication of ErbB receptors for dopaminergic neurons. *Neuroscience* 161 (1):95-110
- Andringa G, Eshuis S, Perentes E, Maguire RP, Roth D, Ibrahim M, Leenders KL, Cools AR (2003) TCH346 prevents motor symptoms and loss of striatal FDOPA uptake in bilaterally MPTP treated primates. *Neurobiol Dis* 14 (2):205-17
- Altunkaynak BZ, Onger ME, Altunkaynak ME, Ayrancı E, Canan S (2012) A Brief Introduction to Stereology and Sampling Strategies: Basic Concepts of Stereology. *Neuroquantology* 10 (1):31-43
- Alvarez-Fischer D, Henze C, Strenzke C, Westrich J, Ferger B, Höglinger GU, Oertel WH, Hartmann A (2008) Characterization of the striatal 6-OHDA model of Parkinson's disease in wild type and alpha-synuclein-deleted mice. *Exp Neurol* 210 (1):182-93
- Alves G, Forsaa EB, Pedersen KF, Gjerstad MD, Larsen JP (2008) Epidemiology of Parkinson's disease. *J Neurol* 255 (5):18-32
- Aron AR, Behrens TE, Smith S, Frank MJ, Poldrack RA (2007) Triangulating a cognitive control network using diffusion-weighted Magnetic resonance imaging (MRI) and functional MRI. *J Neurosci* 27 (14):3743-52
- Baldereschi M, Di Carlo A, Rocca WA, Vanni P, Maggi S, Perissinotto E, Grigoletto F, Amaducci L, Inzitari D (2000) Parkinson's disease and parkinsonism in a longitudinal study: two-fold higher incidence in men. *Neurology* 55 (9):1358-63
- Banks WA (2009) Characteristics of compounds that cross the blood-brain barrier. *BMC Neurol* 9 Suppl 1:3

- Barnham KJ, Masters CL, Bush AI (2004) Neurodegenerative diseases and oxidative stress. *Nat Rev Drug Discov* 3 (3):205-14
- Beal MF (2001) Experimental models of Parkinson's disease. *Nat Rev Neurosci* 2 (5):325-34
- Birchmeier C (2009) ErbB receptors and the development of the nervous system. *Exp Cell Res* 315 (4):611-8
- Blum D, Torch S, Lambeng C, Nissou M-F, Benabid A-L, Sadoul R, Verna J-M (2001) Molecular pathways involved in the neurotoxicity of 6-OHDA, dopamine and MPTP: contribution to the apoptotic theory in Parkinson's disease. *Prog Neurobiol* 65 (2):135-72
- Bove J, Prou D, Perier C, Przedborski S (2005) Toxin-induced models of Parkinson's disease. *NeuroRx* 2 (3):484-94
- Buonanno A, Fischbach GD (2001) Neuregulin and ErbB receptor signaling pathways in the nervous system. *Curr Opin Neurobiol* 11 (3):287-96
- Burke RE, Cadet JL, Kent JD, Karanas AL, Jackson-Lewis V (1990) An assessment of the validity of densitometric measures of striatal tyrosine hydroxylase-positive fibers: relationship to apomorphine-induced rotations in 6-hydroxydopamine lesioned rats. *J Neurosci Methods*. 35 (1):63-73
- Carlsson A, Lindqvist M, Magnusson T (1957) 3,4-Dihydroxyphenylalanine and 5-hydroxy-tryptophan as reserpine antagonists. *Nature* 180 (4596):1200
- Carlsson A (2002) Treatment of Parkinson's with L-DOPA. The early discovery phase, and a comment on current problems. *J Neural Transm* 109 (5-6):777-87
- Carlsson T, Schindler FR, Höllerhage M, Depboylu C, Arrias-Carrión O, Schnurrbusch S, Rösler TW, Wozny W, Schwall GP, Groebe K, Oertel WH, Brundin P, Schrattenholz A, Höglinger GU (2011) Systemic administration of neuregulin-1 β 1 protects dopaminergic neurons in a mouse model of Parkinson's disease. *J Neurochem* 117 (6):1066-74

- Chaturvedi RK, Beal MF (2013) Mitochondria targeted therapeutic approaches in Parkinson's and Huntington's diseases. *Mol Cell Neurosci* 55:101-14.
- Citri A, Yarden Y (2006) EGF-ERBB signalling: towards the systems level. *Nat Rev Mol Cell Biol* 7 (7):505-16
- clinicaltrials.gov [Internet] Bethesda: U.S. National Library of Medicine [zitiert am 25.02.2014]. URL: <http://www.clinicaltrials.gov/show/NCT01214096>
- Cui W, Tao J, Wang Z, Ren M, Zhang Y, Sun Y, Peng Y, Li R (2013) Neuregulin1beta1 Antagonizes Apoptosis Via ErbB4-Dependent Activation of PI3-Kinase/Akt in APP/PS1 Transgenic Mice. *Neurochem Res* 38 (11):2237-46
- Cymer F, Schneider D (2010) Transmembrane helix-helix interactions involved in ErbB receptor signaling. *Cell Adh Migr* 4 (2):299-312
- Dawson T M, Dawson V. L (2003) Molecular pathways of neurodegeneration in Parkinson's disease. *Science* 302 (5646):819-22
- De Long MR, Wichmann T (2007) Circuits and circuit disorders of the basal ganglia. *Arch Neurol* 64 (1):20-4
- De Rijk MC, Launer LJ, Berger K, Breteler MM, Dartigues JF, Baldereschi M, Fratiglioni L, Lobo A, Martinez-Lage J, Trenkwalder C, Hofman A (2000) Prevalence of Parkinson's disease in Europe: a collaborative study of population-based cohorts. Neurologic Diseases in the Elderly Research Group. *Neurology* 54 (11 Suppl 5):21-3
- Depboylu C, Höllerhage M, Schnurrbusch S, Brundin P, Oertel WH, Schrattenholz A, Höglinger GU (2012) Neuregulin-1 receptor tyrosine kinase ErbB4 is upregulated in midbrain dopaminergic neurons in Parkinson disease. *Neurosci Lett* 531 (2):209-14
- Dickson DW, Braak H, Duda JE, Duyckaerts C, Gasser T, Halliday GM, Hardy J, Leverenz JB, Del Tredici K, Bignjew Z, Wszolek K, Lityan I (2009)

Neuropathological assessment of Parkinson's disease: refining the diagnostic criteria. *Lancet Neurol* 8 (12):1150-7. Erratum in: *Lancet Neurol* 9 (2):140

Eggert KM, Oertel WH, Reichmann H, Arnold G, Baas H, Berg D, Braune S, Deuschl G, Dodel R, Gasser T, Gerlach M, Höglinger G, Jost W, Mehdorn HM, Müngersdorf M, Poewe W, Reuther P, Schulz J, Spieker S, Storch A, Tatsch K, Trenkwalder C, Waldvogel D (2008) Parkinson-Syndrome: Diagnostik und Therapie. In: Diener HC, Weimar C, Hrsg. Leitlinien für Diagnostik und Therapie in der Neurologie. 4. Auflage. Stuttgart: Thieme Verlag, 82-112

Eggert KM, Oertel WH, Reichmann H, Arnold G, Baas H, Berg D, Braune S, Deuschl G, Dodel R, Gasser T, Gerlach M, Höglinger G, Jost W, Mehdorn HM, Müngersdorf M, Poewe W, Reuther P, Riederer P, Schulz J, Spieker S, Storch A, Tatsch K, Trenkwalder C, Waldvogel D (2012) Parkinson-Syndrome: Diagnostik und Therapie. In: Diener HC, Weimar C, Hrsg. Leitlinien für Diagnostik und Therapie in der Neurologie. Deutsche Gesellschaft für Neurologie. 5. Auflage. Stuttgart: Thieme Verlag, 124-62

Elbaz A, Bower JH, Maraganore DM, McDonnell SK, Peterson BJ, Ahlskog JE, Schaيد DJ, Rocca WA (2002) Risk tables for parkinsonism and Parkinson's disease. *J Clin Epidemiol* 55 (1):25-31

Esper RM, Pankonin MS, Loeb JA (2006) Neuregulins: Versatile growth and differentiation factors in nervous system development and human disease. *Brain Res Rev* 51 (2):161-75

Fahn S, Cohen G (1992) The oxidant stress hypothesis in Parkinson's disease: evidence supporting it. *Ann Neurol* 32 (6):804-12

Falls DL (2003) Neuregulins: functions, forms and signaling strategies. *Experimental Cell Research* 284 (1):14-30

Franklin KBJ, Paxinos G (1997) The Mouse Brain in Stereotaxic Coordinates. San Diego: Academic Press

- Fujita M, Ichise M, Zoghbi SS, Liow JS, Ghose S, Vines DC, Sangare J, Lu JQ, Cropley VL, Iida H, Kim KM, Cohen RM, Bara-Jimenez W, Ravina B, Innis RB (2006) Widespread decrease of nicotinic acetylcholine receptors in Parkinson's disease. *Ann Neurol* 59 (1):174-7
- Gasmi M, Herzog CD, Brandon EP, Cunningham JJ, Ramirez GA, Ketchum ET, Bartus RT (2007) Striatal delivery of neurturin by CERE-120, an AAV2 vector for the treatment of dopaminergic neuron degeneration in Parkinson's disease. *Mol Ther* 15 (1):62-8
- German Coenzyme Q(10) Study Group (2007) Randomized, double-blind, placebocontrolled trial on symptomatic effects of coenzyme Q(10) in Parkinson disease. *Arch Neurol* 64 (7):938-44
- Gibb WRR, Lees AJ (1988) The relevance of the Lewy body to the pathogenesis of idiopathic Parkinson's disease. *J Neurol Neurosurg Psychiatr* 51 (6):745-52
- Gill SS, Patel NK, Hotton GR, O'Sullivan K, McCarter R, Bunnage M, Brooks DJ, Svendsen CN, Heywood P (2003) Direct brain infusion of glialcell line-derived neurotrophic factor in Parkinson disease. *Nat Med* 9 (5):589-95
- Glaser EM, Wilson PD (1998) The coefficient of error of optical fractionator population size estimates: a computer simulation comparing three estimators. *J Microsc* 192 (Pt 2):163-71
- Glinka Y, Gassen M, Youdim MB (1997) Mechanism of 6-hydroxydopamine neurotoxicity. *J Neural Transm Suppl* 50:55-66
- Götz CG (1986) Charcot on Parkinson's disease. *Mov Disord* 1 (1):27-32
- Grealish S, Mattsson B, Draxler P, Björklund A (2010) Characterisation of behavioural and neurodegenerative changes induced by intranigral 6-hydroxydopamine lesions in a mouse model of Parkinson's disease. *Eur J Neurosci* 31 (12):2266-78

- Harrison PJ, Law AJ (2006) Neuregulin 1 and Schizophrenia: Genetics, Gene Expression, and Neurobiology. *Biol Psychiatry* 60 (2):132-40
- Hauser RA, Holford NH (2002) Quantitative description of loss of clinical benefit following withdrawal of levodopa–carbidopa and bromocriptine in early Parkinson's disease. *Mov Disord* 17(5):961-8
- Heikkila R, Cohen G (1971) Inhibition of biogenic amine uptake by hydrogen peroxide: a mechanism for toxic effects of 6-hydroxydopamine. *Science* 172 (3989):1257-8
- Hikosaka O, Wurtz RH (1983) Visual and oculomotor functions of monkey substantia nigra pars reticulata. III. Memory-contingent visual and saccade responses. *J Neurophysiol* 49 (5):1268-84
- Hirsch EC, Hunot S (2009) Neuroinflammation in Parkinson's disease: a target for neuroprotection? *Lancet Neurol* 8 (4):382-97
- Höglinger GU, Lannuzel A, Khondiker ME, Michel PP, Duyckaerts C, Féger J, Champy P, Prigent A, Medja F, Lombes A, Oertel WH, Ruberg M, Hirsch EC (2005) The mitochondrial complex I inhibitor rotenone triggers a cerebral tauopathy. *J Neurochem* 95 (4):930-9
- Hovland Jr DN, Boyd RB, Butt MT, Engelhardt JA, Moxness MS, Ma MH, Emery MG, Ernst NB, Reed RP, Zeller JR, Gash DM, Masterman DM, Potter BM, Cosenza ME, Lightfoot RM (2007) Six month continuous intraputamenal infusion toxicity study of recombinant methionyl human glial cell line-derived neurotrophic factor (r-metHuGDNF) in rhesus monkeys. *Toxicol Pathol* 35 (7):1013-29
- Iancu R, Mohapel P, Brundin P, Paul G (2005) Behavioral characterization of a unilateral 6-OHDA-lesion model of Parkinson's disease in mice. *Behav Brain Res* 162 (1):1-10

- Iwakura Y, Nawa H (2013) ErbB1-4-dependent EGF/neuregulin signals and their cross talk in the central nervous system: pathological implications in schizophrenia and Parkinson's disease. *Front Cell Neurosci* 7:4
- Jabbour A, Hayward CS, Keogh AM, Kotlyar E, McCrohon JA, England JF, Amor R, Liu X, Li XY, Zhou MD, Graham RM, Macdonald PS (2011) Parenteral administration of recombinant human neuregulin-1 to patients with stable chronic heart failure produces favourable acute and chronic haemodynamic responses. *Eur J Heart Fail* 13 (1):83-92
- Jeon BS, Jackson-Lewis V, Burke (1995) 6-Hydroxydopamine lesion of the rat substantia nigra: time course and morphology of cell death. *Neurodegeneration* 4 (2):131-7
- Kastin AJ, Akerstrom V, Pan W (2004) Neuregulin-1-beta1 enters brain and spinal cord by receptor-mediated transport. *J Neurochem* 88 (4):965-70
- Kordower JH, Herzog CD, Dass B, Bakay RA, Stansell J, Gasmi M, Bartus RT (2006) Delivery of neurturin by AAV2 (CERE-120)-mediated gene transfer provides structural and functional neuroprotection and neurorestoration in MPTP-treated monkeys. *Ann Neurol* 60 (6):706-15
- Lang AE, Obeso JA (2004) Challenges in Parkinson's disease: restoration of the nigrostriatal dopamine system is not enough. *Lancet Neurol* 3 (5):309-16
- Lang AE, Gill S, Patel NK, Lozano A, Nutt JG, Penn R, Brooks DJ, Hotton G, Moro E, Heywood P, Brodsky MA, Burchiel K, Kelly P, Dalvi A, Scott B, Stacy M, Turner D, Wooten VG, Elias WJ, Laws ER, Dhawan V, Stoessl AJ, Matcham J, Coffey RJ, Traub M (2006) Randomized controlled trial of intraputamenal glial cell line-derived neurotrophic factor infusion in Parkinson disease. *Ann Neurol* 59 (3):459-66. Erratum in: *Ann Neurol* 60 (6):747
- Li Q, Loeb JA (2001) Neuregulin-heparan-sulfate proteoglycan interactions produce sustained erbB receptor activation required for the induction of acetylcholine receptors in muscle. *J Biol Chem* 276 (41):38068-75

- Lindholm P, Voutilainen MH, Laurén J, Peränen J, Leppänen VM, Andressoo JO, Lindahl M, Janhunen S, Kalkkinen N, Timmusk T, Tuominen RK, Saarma M (2007) *Nature* 448 (7149):73-7
- Linggi B, Carpenter G (2006) ErbB receptors: new insights on mechanisms and biology. *Trends Cell Biol* 16 (12):649-56
- Löhle M, Reichmann H (2010) Clinical neuroprotection in Parkinson's disease - still waiting for the breakthrough. *J Neurol Sci* 289 (1-2):104-14
- Lundblad M, Decressac M, Mattsson B, Björklund A (2012) Impaired neurotransmission caused by overexpression of α -synuclein in nigral dopamine neurons. *Proc Natl Acad Sci USA* 109 (9):3213-9
- Marks WJ Jr, Ostrem JL, Verhagen L, Starr PA, Larson PS, Bakay RA, Taylor R, Cahn-Weiner DA, Stoessl AJ, Olanow CW, Bartus RT (2008) Safety and tolerability of intraputamin delivery of CERE-120 (adeno-associated virus serotype 2-neurturin) to patients with idiopathic Parkinson's disease: an open-label, phase I trial. *Lancet Neurol* 7 (5):400-8
- Marti MJ, James CJ, Oo TF, Kelly WJ, Burke RE (1997) Early developmental destruction of terminals in the striatal target induces apoptosis in dopamine neurons of the substantia nigra. *J Neurosci* 17 (6):2030-9
- Martin WR (2009) Quantitative estimation of regional brain iron with magnetic resonance imaging. *Parkinsonism Relat Disord* 15 (3):215-8
- McNaught KS, Olanow CW (2003) Proteolytic stress: a unifying concept for the etiopathogenesis of Parkinson's disease. *Ann Neurol* 53 (3):73-6
- Mei L, Xiong WC (2008) Neuregulin 1 in neural development, synaptic plasticity and schizophrenia. *Nat Rev Neurosci* 9 (6):437-52
- Nambu A, Tokuno H, Takada M (2002) Functional significance of the cortico-subthalamo-pallidal 'hyperdirect' pathway. *Neuroscience* 43 (2):111-7

- NINDS NET-PD Investigators (2006) A randomized, double-blind, futility clinical trial of creatine and minocycline in early Parkinson disease. *Neurology* 66 (5):664-71
- Nutt JG, Burchiel KJ, Comella CL, Jankovic J, Lang AE, Laws ER Jr, Lozano AM, Penn RD, Simpson RK Jr, Stacy M, Wooten GF (2003) Randomized, double-blind trial of glial cell line-derived neurotrophic factor (GDNF) in PD. *Neurology* 60 (1):69-73
- Obeso JA, Rodríguez-Oroz MC, Benitez-Temino B, Blesa FJ, Guridi J, Marin C, Rodriguez M (2008) Functional organization of the basal ganglia: therapeutic implications for Parkinson's disease. *Mov Disord* 23 (3):548-59
- Oertel WH, Berardelli A, Bloem BR, Bonuccelli U, Burn D, Deuschl G, Dietrichs E, Fabbrini G, Ferreira JJ, Friedman A, Kanovsky P, Kostic V, Nieuwboer A, Odin P, Poewe W, Rascol O, Sampaio C, Schüpbach M, Tolosa E, Trenkwalder C (2011) Review of the therapeutic management of Parkinson's disease. In: Gilhus NE, Barnes MP, Brainin M, Hrsg. *European handbook of neurological management*, Chapter 14: Part I: early (uncomplicated) Parkinson's disease. *European Handbook of Neurological Management*. 2nd ed. Vol 1. Oxford: Wiley-Blackwell 217-36
- Olanow CW, Hauser RA, Gauger L, Malapira T, Koller W, Hubble J, Bushenbark K, Lilienfeld D, Esterlitz J (1995) The effect of deprenyl and levodopa on the progression of Parkinson's disease. *Ann Neurol* 38 (5):771-7
- Olanow CW, Schapira AH, LeWitt PA, Kieburtz K, Sauer D, Olivieri G, Pohlmann H, Hubble J (2006) TCH346 as a neuroprotective drug in Parkinson's disease: a double-blind, randomised, controlled trial. *Lancet Neurol* 5 (12):1013-20
- Olayioye MA, Neve RM, Lane HA, Hynes NE (2000) The ErbB signaling network: receptor heterodimerization in development and cancer. *EMBO J* 19 (13):3159-67
- Oldendorf WH (1974) Lipid solubility and drug penetration of the blood brain barrier. *Proc Soc Exp Biol Med* 147 (3):813-5

- Parkinson J (1817) An essay on the shaking palsy. London: Whittingham and Rowland
- Parkinson Study Group (1989) DATATOP: a multicenter controlled clinical trial in early Parkinson's disease. *Arch Neurol* 46 (10):1052-60
- Parkinson Study Group (1996) Effect of lazabemide on the progression of disability in early Parkinson's disease. *Ann Neurol* 40:99-107
- Parkinson Study Group (2002) Dopamine transporter brain imaging to assess the effects of pramipexole vs levodopa on Parkinson disease progression. *JAMA* 287 (13):1653–61
- Parkinson Study Group (2005) A randomized placebo-controlled trial of rasagiline in levodopa-treated patients with Parkinson disease and motor fluctuations: the PRESTO study. *Arch Neurol* 2005 62 (2):241-8
- Pickel VM, Joh TH, Reis DJ (1975) Ultrastructural localization of tyrosine hydroxylase in noradrenergic neurons of brain. *Proc Natl Acad Sci USA* 72 (2):659-63
- Rascol O, Olanow W, Brooks D, Koch G, Truffinet P, Bejuit R (2002) A 2-year, multicenter, placebo-controlled, double-blind, parallel-group study of the effect of riluzole on Parkinson's disease progression. *Mov Disord* 17 (5):39
- Reichmann H (2008) Initiation of Parkinson's disease treatment. *J Neurol* 255 (5):57-9
- Rio C, Rieff HI, Qi P, Khurana TS, Corfas G (1997) Neuregulin and erbB receptors play a critical role in neuronal migration. *Neuron* 19 (1):39-50
- Rösler TW, Depboylu C, Arias-Carrión O, Wozny W, Carlsson T, Höllerhage M, Oertel WH, Schrattenholz A, Höglinger GU (2011) Biodistribution and brain permeability of the extracellular domain of neuregulin-1-β1. *Neuropharmacology* 61 (8):1413-8
- Rodriguez MC, Obeso JA, Olanow CW (1998): Subthalamic nucleus-mediated excitotoxicity in Parkinson's disease: a target for neuroprotection. *Ann Neurol* 44 (3 Suppl 1):175-88

- Samaga R, Saez-Rodriguez J, Alexopoulos LG, Sorger PK, Klamt S (2009) The logic of EGFR/ErbB signaling: theoretical properties and analysis of high-throughput data. *PLoS Comput Biol* 5 (8): e1000438
- Samii A, Nutt JG, Ransom BR (2004) Parkinson's disease. *Lancet* 363 (9423):1783-93
- Saner A, Thoenen H (1971) Model experiments on the molecular mechanism of action of 6-hydroxydopamine. *Mol Pharmacol* 7 (2):147-54
- Saporito MS, Hudkins RL, Maroney AC (2002) Discovery of CEP-1347/KT-7515, an inhibitor of the JNK/SAPK pathway for the treatment of neurodegenerative diseases. *Prog Med Chem* 40:23–62
- Sauer H, Oertel WH (1994) Progressive degeneration of nigrostriatal dopamine neurons following intrastriatal terminal lesions with 6-hydroxydopamine: a combined retrograde tracing and immunocytochemical study in the rat. *Neuroscience* 59 (2):401-15
- Sawyer DB, Caggiano A (2011) Neuregulin-1 β for the treatment of systolic heart failure. *J Mol Cell Cardiol* 51 (4):501-5
- Schapira AH, Olanow CW (2004) Neuroprotection in Parkinson disease: mysteries, myths, and misconceptions. *JAMA* 291 (3):358-64
- Schapira AH (2006) Etiology of Parkinson's disease. *Neurology* 66 (10 Suppl 4):10-23
- Schapira A, Hartmann A, Agid Y, Hrsg. (2009) *Parkinsonian Disorders in Clinical Practice*. Oxford: Wiley-Blackwell
- Schmitz C, Hof PR (2005) Design-based stereology in neuroscience. *Neuroscience* 130 (4):813-31
- Simón-Sánchez J, Schulte C, Bras JM, Sharma M, Gibbs JR, Berg D, Paisan-Ruiz C, Lichtner P, Scholz SW, Hernandez DG, Krüger R, Federoff M, Klein C, Goate A, Perlmutter J, Bonin M, Nalls MA, Illig T, Gieger C, Houlden H, Steffens M, Okun MS, Racette BA, Cookson MR, Foote KD, Fernandez HH, Traynor BJ,

- Schreiber S, Arepalli S, Zonozi R, Gwinn K, van der Brug M, Lopez G, Chanock SJ, Schatzkin A, Park Y, Hollenbeck A, Gao J, Huang X, Wood NW, Lorenz D, Deuschl G, Chen H, Riess O, Hardy JA, Singleton AB, Gasser T (2009) Genome-wide association study reveals genetic risk underlying Parkinson's disease. *Nat Genet* 41 (12):1308-12
- Spillantini MG, Schmidt ML, Lee VM, Trojanowski JQ, Jakes R, Goedert M (1997) Alpha-synuclein in Lewy bodies. *Nature* 388 (6645):839-40
- Steiner JA, Angot E, Brundin P (2011) A deadly spread: cellular mechanisms of α -synuclein transfer. *Cell Death Differ* 18 (9):1425-33
- Steinthorsdottir, V, Stefansson, H, Ghosh, S., Birgisdottir B, Bjornsdottir S, Fasquel AC, Olafsson O, Stefansson K, Gulcher JR (2004) Multiple novel transcription initiation sites for NRG1. *Gene* 342 (1):97-105
- Talmage DA (2008) Mechanisms of neuregulin action. *Novartis Found Symp* 289:74-93
- Thoenen H, Sendtner M (2002) Neurotrophins: from enthusiastic expectations through sobering experiences to rational therapeutic approaches. *Nat Neurosci* 5 Suppl:1046-50
- Thuret S, Alavian KN, Gassmann M, Lloyd CK, Smits SM, Smidt MP, Klein R, Dyck RH, Simon HH (2004) The neuregulin receptor, ErbB4, is not required for normal development and adult maintenance of the substantia nigra pars compacta. *J Neurochem* 91 (6):1302-11
- Turner RS, Anderson ME (2005) Context-dependent modulation of movement-related discharge in the primate globus pallidus. *J Neurosci* 25 (11):2965-76
- Ungerstedt U, Arbuthnott GW (1970) Quantitative recording of rotational behavior in rats after 6-hydroxy-dopamine lesions of the nigrostriatal dopamine system. *Brain Res* 24 (3):485-93

- Von Voigtlander PF, Moore KE (1973) Turning behavior of mice with unilateral 6-hydroxydopamine lesions in the striatum: effects of apomorphine, L-DOPA, amantadine, amphetamine and other psychomotor stimulants. *Neuropharmacology* 12 (5):451-62
- Vila M, Przedborski S (2003) Targeting programmed cell death in neurodegenerative diseases. *Nat Rev Neurosci* 4 (5):365-75
- Wakabayashi K, Tanji K, Mori F, Takahashi H (2007) The Lewy body in Parkinson's disease: molecules implicated in the formation and degradation of α -synuclein aggregates. *Neuropathology* 27 (5):494-506
- Wang YN, Yamaguchi H, Hsu JM, Hung MC (2010) Nuclear trafficking of the epidermal growth factor receptor family membrane proteins. *Oncogene* 29 (28):3997-4006
- Waters CM, Peck R, Rossor M, Reynolds GP, Hunt SP (1988) Immunocytochemical studies on the basal ganglia and substantia nigra in Parkinson's disease and Huntington's chorea. *Neuroscience* 25 (2):419-38
- West MJ (2001) Design based stereological methods for estimating the total number of objects in histological material. *Folia Morphol (Warsz)* 60 (1):11-9
- Whone AL, Watts RL, Stoessl AJ, Davis M, Reske S, Nahmias C, Lang AE, Rascol O, Ribeiro MJ, Remy P, Poewe WH, Hauser RA, Brooks DJ; (2003) Slower progression of Parkinson's disease with ropinirole versus levodopa: the REALPET study. *Ann Neurol* 54 (1):93-101
- Wood-Kaczmar A, Gandhi S, Wood NW (2006) Understanding the molecular causes of Parkinson's disease. *Trends Mol Med* 12 (11):521-8
- Xu C, Lv L, Zheng G, Li B, Gao L, Sun Y (2012) Neuregulin1 β 1 protects oligodendrocyte progenitor cells from oxygen glucose deprivation injury induced apoptosis via ErbB4-dependent activation of PI3-kinase/Akt. *Brain Res* 1467:104-12

- Yacoubian TA, Standaert DG (2009) Targets for neuroprotection in Parkinson's disease. *Biochim Biophys Acta* 1792 (7):676-87
- Yan X, Morgan JP (2011) Neuregulin1 as novel therapy for heart failure. *Curr Pharm Des* 17 (18):1808-17
- Yarden Y, Sliwkowski MX (2001) Understanding the ErbB signaling network. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2 (2):127-37
- Yurek DM, Zhang L, Fletcher-Turner A, Seroogy KB (2004) Supranigral injection of neuregulin1-beta induces striatal dopamine overflow. *Brain Res* 1028 (1):116-9
- Zhang L, Fletcher-Turner A, Lundgren KH, Marchionni M, Yurek DM, Seroogy KB (2004) Neurotrophic and neuroprotective effects of the neuregulin glial growth factor-2 on dopaminergic neurons in rat primary midbrain cultures. *J Neurochem* 91:1358-68
- Zheng,Y Watakabe A, Takada M, Kakita A, Namba H, Takahashi H, Yamamori T, Nawa H (2009) Expression of ErbB4 in substantia nigra dopamine neurons of monkeys and humans. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry* 33 (4):701-6
- Zigmond MJ, Burke RE (2002) Pathophysiology of Parkinson's disease. In: Davis KL, Coyle J, Charney D, Nemeroff C, Hrsg. Fifth generation of progress. American College of Neuropsychopharmacology. Philadelphia: Lippincott, Williams and Wilkins, 1781-94

VIII. Publikation

Carlsson T, Schindler FR, Höllerhage M, Depboylu C, Arrias-Carrión O, Schnurrbusch S, Rösler TW, Wozny W, Schwall GP, Groebe K, Oertel WH, Brundin P, Schrattenholz A, Höglinger GU (2011) Systemic administration of neuregulin-1 β 1 protects dopaminergic neurons in a mouse model of Parkinson's disease. J Neurochem 117:1066-74

IX. Tabellarische Auflistung der Ergebnisse der einzelnen Versuchstiere

Läsion	Behandlung	Gruppe	Amphetamin-induzierte Rotationen zur Operationsseite pro Minute (*)	Striatale Faserdichte (% der Kontrollseite)	TH-pos. Neurone der Substantia nigra (% der Kontrollseite)	KV-pos. Neurone der Substantia nigra (% der Kontrollseite)
Plazebo	Plazebo	P – P	0,7	102,9	97,9	94,4
Plazebo	Plazebo	P – P	1,8	98,2	96,7	96,9
Plazebo	Plazebo	P – P	- 0,7	96,1	105,7	96,2
Plazebo	Plazebo	P – P	0,2	111,6	94,8	102,1
Plazebo	Plazebo	P – P	0,9	97,91	95,4	98,2
Plazebo	Plazebo	P – P	0,1	112,4	103,2	99,6
Plazebo	Plazebo	P – P	1,0	83,2	96,2	100,0
Plazebo	Plazebo	P – P	0,9	93,7	90,3	102,2
Plazebo	Plazebo	P – P	0,0	90,3	101,7	89,3
Plazebo	Plazebo	P – P	- 0,4	81,2	95,1	96,2
Plazebo	Neuregulin	P – N	- 2,6	100,5	96,1	98,1
Plazebo	Neuregulin	P – N	0,3	105,2	102,8	94,2
Plazebo	Neuregulin	P – N	0,3	88,7	105,2	101,9
Plazebo	Neuregulin	P – N	0,6	108,9	98,3	95,2
Plazebo	Neuregulin	P – N	- 2,1	95,6	96,8	92,3
Plazebo	Neuregulin	P – N	0,6	107,2	105,3	98,6
Plazebo	Neuregulin	P – N	- 0,7	95,5	104,9	99,2
Plazebo	Neuregulin	P – N	1,6	103,5	94,2	99,6
Plazebo	Neuregulin	P – N	0,0	111,3	94,5	92,0
Plazebo	Neuregulin	P – N	- 1,9	101,0	95,2	98,1
Plazebo	Neuregulin	P – N	- 0,3	108,3	97,8	93,6
Plazebo	Neuregulin	P – N	0,9	88,9	95,5	89,8
6-OHDA	Plazebo	6 – P	2,8	33,6	18,3	33,3
6-OHDA	Plazebo	6 – P	0,4	63,7	33,3	32,5
6-OHDA	Plazebo	6 – P	1,8	64,4	40	32,1
6-OHDA	Plazebo	6 – P	6,1	22,3	45,4	43,5
6-OHDA	Plazebo	6 – P	2,9	36,4	35	31,3
6-OHDA	Plazebo	6 – P	0,6	44,3	35,8	34,8
6-OHDA	Plazebo	6 – P	0,6	56,2	33,8	32,9
6-OHDA	Plazebo	6 – P	3,6	39,7	41,4	34,9
6-OHDA	Plazebo	6 – P	1,1	62,1	34,8	44,0
6-OHDA	Plazebo	6 – P	4,5	57,3	35,4	34,5
6-OHDA	Neuregulin	6 – N	1,1	91,5	68,3	70,6
6-OHDA	Neuregulin	6 – N	- 1,6	81,6	64,0	70,6
6-OHDA	Neuregulin	6 – N	- 0,2	60,3	45,8	73,8
6-OHDA	Neuregulin	6 – N	5,0	115,2	59,0	62,9
6-OHDA	Neuregulin	6 – N	1,4	78,6	68,7	65,7
6-OHDA	Neuregulin	6 – N	3,3	66,9	59,1	65,5
6-OHDA	Neuregulin	6 – N	0,1	63,5	45,5	60,3
6-OHDA	Neuregulin	6 – N	0,3	70,3	70,7	73,5
6-OHDA	Neuregulin	6 – N	0,4	55,8	71,5	75,2
6-OHDA	Neuregulin	6 – N	1,3	68,4	60,2	60,8
6-OHDA	Neuregulin verzögert	6 – vN	3,8	56,5	95,2	84,6
6-OHDA	Neuregulin verzögert	6 – vN	0,7	59,8	74,2	67,8
6-OHDA	Neuregulin verzögert	6 – vN	3,5	27,3	37,1	43,2
6-OHDA	Neuregulin verzögert	6 – vN	0,6	30,1	40	78,3
6-OHDA	Neuregulin verzögert	6 – vN	0,8	59,3	53,4	53,6
6-OHDA	Neuregulin verzögert	6 – vN	1,3	60,7	75,2	71,2
6-OHDA	Neuregulin verzögert	6 – vN	2,3	45,8	54,7	61,9
6-OHDA	Neuregulin verzögert	6 – vN	1,0	57,6	50,5	55,9
6-OHDA	Neuregulin verzögert	6 – vN	4,4	17,4	85,6	73,2
6-OHDA	Neuregulin verzögert	6 – vN	1,5	32,0	37,5	42,2
6-OHDA	Neuregulin verzögert	6 – vN	0,7	54,5	51,6	59,7

* Rotationen entgegen der Operationsseite sind durch ein negatives Vorzeichen gekennzeichnet.

X. Lebenslauf

Persönliche Angaben

Geburtsdatum: 31.03.1985

Geburtsort: Marburg

Nationalität: Deutsch

Eltern: Dr. Rudolf Gottfried Schindler, Facharzt für Allgemeinmedizin
Bettina Schindler, geb. Block, OP-Schwester

Geschwister: Rudolf David Schindler, Student der Historischen Sprach-,
Text- und Kulturwissenschaften
Roman Christoph Schindler, Student der Informatik
Theresa Isabell Schindler, Studentin der Humanmedizin

Familienstand: Ledig

Kinder: Jakob Leonard Schindler,
Elisabeth Rebecca Schindler

Schulische Ausbildung

08/1990 – 07/1994: Gerhart-Hauptmann-Grundschule, Marburg

08/1994 – 06/2004: Gymnasium Philippinum, Marburg

06/2004: **Allgemeine Hochschulreife**
Gymnasium Philippinum, Marburg

Universitäre Ausbildung

10/2004 – 12/2011: **Studium der Humanmedizin**
Philipps-Universität, Marburg

12/2012: 2. Staatsexamen und Erlangung der Approbation

Praktika und Famulaturen

Praktika:

- 01 – 02/2000: **Dermatologische Praxis** Dr. med. Carola Sonnevend,
Universitätsstr. 26, 35037 Marburg
- 07 – 10/2004
und 02 – 03/2005: **Chirurgie**, Diakonie-Krankenhaus Wehrda, Hebronberg 5,
35041 Marburg

Famulaturen:

- 08 – 09/2007: **Chirurgie**, Diakonie-Krankenhaus Wehrda
- 09 – 10/2007: **Innere Medizin**, Diakonie-Krankenhaus Wehrda
- 02 – 03/2008: **Internistische Gemeinschaftspraxis** Dres. Drude,
Simon, Hoffmann, Frank, Goecke-Dommers, Biegenstr. 3,
35037 Marburg
- 07 – 07/2009: **Internistische Gemeinschaftspraxis** Dres. von Knoblauch zu
Hatzbach, Born, Wieder, Erlenring 19, 35037 Marburg
- 01 – 02/2010: **Sonographie**, Universitätsklinikum Marburg, Baldinger Str.,
35043 Marburg

Praktisches Jahr:

- 08/2010 – 01/2011: **Abteilung für Innere Medizin**, Universitätsklinikum Marburg
- 01 – 05/2011: **Abteilung für Anästhesie und Intensivtherapie**,
Universitätsklinikum Marburg
- 05 – 08/2011: **Abteilung für Unfall-, Hand- und
Wiederherstellungschirurgie** sowie **Abteilung für Visceral-,
Thorax- und Gefäßchirurgie**, Universitätsklinikum Marburg

Berufserfahrung

- 01/2012 – 04/2012: Abteilung für Innere Medizin, Diakonie-Krankenhaus Wehrda
- Seit 05/2012: Abteilung für Innere Medizin, Asklepios Klinik Lich GmbH,
Goethestr.4, 35432 Lich

Fähigkeiten und Interessen

Sprachen:

Deutsch:	Muttersprache
Englisch:	Verhandlungssicher
Latein:	Latinum
Altgriechisch:	Graecum

Interessen:

Rhönradturnen (8fache Juniorenweltmeisterin, 9fache Deutsche Schüler- bzw. Jugendmeisterin)
Ehrenamtliche Tätigkeiten beim TSV Kirchhain und TSV Eintracht Stadtallendorf
Sport
Klavier spielen
Singen
Literatur
Malen
Sprachen
Reisen

XI. Verzeichnis der akademischen Lehrer

Meine akademischen Lehrer in Marburg waren die Damen und Herren Adamkiewicz, Aigner, Aumüller, Barth, Bartsch, Basler, Baum, Baumann, Becker, Berger, Bette, Bien, Carlsson, Cetin, Czubayko, Daut, Del Rey, Depboylu, Dietrich, Dodel, Donner-Banzhoff, Eberhart, Eilers, Fendrich, Feuser, Fuchs-Winkelmann, Geks, Gerdes, Glorius, Görg, Gress, Grimm, Grundmann, Grzeschik, Hasilik, Hegele, Hertl, Höffken, Hofmann, Höglinger, Hoyer, Kann, Kaufmann, Kill, Klingmüller, Klose, Köhler, Koolman, Krieg, Kroll, Krones, Kuhlmann, Langer, Lill, Liss, Löffler, Lohoff, Maier, Maisch, Mandrek, Mittag, Moll, Moosdorf, Morin, Mueller, Müller, Mutters, Neubauer, Neumüller, Oertel, Olbert, Pagenstecher, Ramaswamy, Rausch, Renz, Richter, Röhm, Rölke, Röper, Rosenow, Rothmund, Ruchholtz, Schäfer, Schrader, Schlosser, Schmidt, Schofer, Seitz, Sesterhenn, Sekundo, Sommer, Sönnichsen, Steiniger, Tackenberg, Teymoortash, Vogelmeyer, Voigt, Wagner, Waldegger, Weihe, Wennemuth, Werner, Westermann, Wiegand, Wulff, Zemlin, Ziring.

XII. Danksagung

Obwohl es leicht ungerecht erscheint, an dieser Stelle einzelne Namen zu nennen, ist es mir eine mehr als angenehme Ehrenpflicht an erster Stelle Herrn Professor Oertel, meinen Doktorvater, zu nennen. Ich bedanke mich für die vertrauensvolle Annahme als Doktorandin und die besten Arbeitsbedingungen, die ein zielorientiertes und dennoch von größter Freude geprägtes Arbeiten möglich gemacht haben.

Ich bedanke mich bei Herrn Professor Höglinger, dem Leiter der Arbeitsgruppe, für all die Unterstützung und Kritik.

Herrn PhD Carlson, der mich während des praktischen Teils der Doktorarbeit betreute, möchte ich für die schöne und erfolgreiche Zusammenarbeit danken. Er förderte nicht nur meine Motivation und mein Interesse, sondern auch die Faszination für die wissenschaftliche Tätigkeit.

Mein Dank gilt natürlich auch Herrn PD Dr. Depboylu für die Übernahme der Betreuung und sein Engagement für unser Projekt.

Weiterhin möchte ich Silke Caspari und Sabine Anfimov danken, die mir nicht nur in Ihrer Funktion als medizinisch-technische Assistentinnen bei Anfragen und Problemen stets zur Seite standen.

XIII. Ehrenwörtliche Erklärung

Ich, Friederike Rebecca Schindler, erkläre ehrenwörtlich, dass ich die dem Fachbereich Medizin Marburg zur Promotionsprüfung eingereichte Arbeit mit dem Titel „Die Bedeutung von Neuregulin im 6-OHDA Tiermodell der Parkinson Krankheit“ in der Klinik für Neurologie unter Leitung von Herrn Prof. Dr. med. Dr. h.c. Wolfgang H. Oertel mit Unterstützung durch die Herren Prof. Dr. med. Höglinger, PhD Thomas Carlsson und PD Dr. med. Candan Depboylu selbst durchgeführt und bei der Abfassung der Arbeit keine anderen als die in der Dissertation aufgeführten Hilfsmittel benutzt habe. Ich habe bisher an keinem anderen in- oder ausländischen Medizinischen Fachbereich ein Gesuch um Zulassung zur Promotion eingereicht, noch die vorliegende oder eine andere Arbeit als Dissertation vorgelegt. Die vorliegende Arbeit wurde unter dem Titel „Systemic administration of neuregulin-1 β 1 protects dopaminergic neurons in a mouse model of Parkinson's disease“ (Journal of Neurochemistry), wie unter „VIII. Publikation“ erwähnt, veröffentlicht.

Ort, Datum

Unterschrift